

THESIS

MUNICH

1966

BIOLOGISCHE BESTIMMUNG
DER ACTH-AKTIVITÄT
IM MENSCHLICHEN PLASMA

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF. 94304

Robert Hacker

AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. Dr. Gustav BODECHTEL

BIOLOGISCHE BESTIMMUNG DER ACTH-AKTIVITÄT
IM MENSCHLICHEN PLASMA*

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Robert Hacker

aus

Bayreuth

1966

*Mit Unterstützung der Stiftung Volkswagenwerk, der Deutschen
Forschungsgemeinschaft, der CB-Stiftung und der Friedrich -
Baur - Stiftung

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. K. Schwarz

Mitberichterstatter: Professor Dr. Dr. G. Bodechtel

Dekan: Professor Dr. F. Holle

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Oktober 1967

Fotodruck: Mikrokopie GmbH, 8 München 22, Bruderstraße 9

MEINEN LIEBEN ELTERN

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Dr. med. K. SCHWARZ und
Herrn Priv. Doz. Dr. med. P. C. SCRIBA
für wohlwollende Förderung und Beratung,
Frau D. SEIBERT für ihre ausgezeichnete
Assistenz bei vielen Versuchen und
Fräulein F. HAAG für die Herstellung der
photographischen Abbildungen.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	9
METHODEN UND PRÄPARATE	
1) Parapharyngeale Hypophysektomie bei Ratten	14
2) Gefäßkatheter bei der Ratte	22
3) Blutentnahme aus dem Nebennierenvenenkatheter	26
4) Fluorimetrische Corticosteronbestimmung	27
5) ACTH-Standardlösungen	33
6) Punktion des Bulbus cranialis venae jugularis beim Menschen	34
7) ACTH-Bestimmung	35
8) Fluorimetrische Bestimmung der sog. "11-Hydroxy-Corticosteroide" im Plasma	38
ERGEBNISSE	
I. Corticosteronbestimmung	
1) Corticosteron-Eichkurven	41
2) Basisfluoreszenz von Rattenplasma	42
3) Ausbeute bei Corticosteronzusatz zu Rattenplasma	44
II. Sog. "11-Hydroxy-Corticosteroide" im menschlichen Plasma	
1) Tagesschwankungen	45
2) Verhalten des Plasmaspiegels nach rascher intravenöser Infusion von Dexamethason	47
III. Corticosteronsekretion in das Nebennierenvenenblut der Ratte nach Hypophysektomie	50
IV. ACTH-Wirkung auf die Corticosteronsekretion	
1) Verhalten der Corticosteronmengen im Nebennierenvenenblut nach einmaliger intraarterieller Applikation von ACTH	53

	Seite
2) Vergleich der Corticosteronmengen pro Zeiteinheit mit der Corticosteronkonzentration im Nebennieren- venenplasma nach ACTH-Gaben	57
V. ACTH-Eichkurven	59
VI. ACTH-Spiegel im menschlichen Plasma	
1) Applikation von menschlichem Plasma in die Ratten- aorta	66
2) ACTH-Plasmaspiegel bei Normalpersonen und bei Patienten mit Erkrankungen des Hypophysen-Neben- nierenrinden-Systems	69
VII. Halbwertszeit des endogenen ACTH	71
VIII. Casuistik	74
DISKUSSION	79
ZUSAMMENFASSUNG	84
LITERATURVERZEICHNIS	85
LEBENS LAUF	

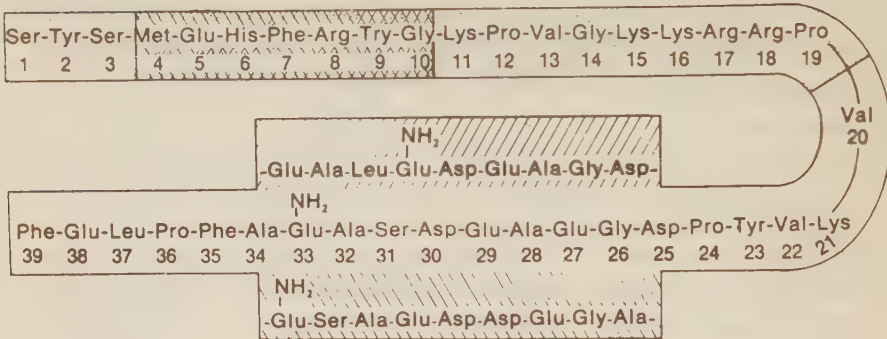
EINLEITUNG

Etwa im Jahre 1920 wurde erstmals die Existenz eines Sekrets aus dem Hypophysenvorderlappen mit selektiver Wirkung auf die Nebennierenrinde postuliert. 1930 gelang SMITH Ph. E. (1) der Nachweis, daß die Hypophysektomie bei Ratten zur Atrophie der Nebennierenrinde führt, wogegen die Implantation von Hypophysenvorderlappen diese Atrophie zu verhindern imstande ist. 1933 wurde das als adrenocorticotropes Hormon bezeichnete wirksame Prinzip etwa gleichzeitig von COLLIP (2, 3) und ANSELMINO (4, 5) aus Acetontrockenpulver von Rinder-Hypophysenvorderlappen angereichert und auf Grund seiner Wirkung als derjenige Faktor definiert, der die Größe der Nebennierenrinde nach Hypophysektomie aufrecht erhält (2, 5, 6).

Im Jahre 1942 gelang LI, EVANS und SIMPSON (7) die Isolierung eines offenbar homogenen Peptids aus Schafshypophysen mit ACTH-Wirksamkeit und einem Molekulargewicht von ungefähr 20 000. Kurze Zeit später wurde aus Schweinehypophysen ein hochgereinigtes Peptid mit einem ähnlichen Molekulargewicht isoliert, das ebenfalls ACTH-Wirksamkeit aufwies. 1954 endlich lagen Polypeptide mit ACTH-Aktivität von Schaf, Schwein, Rind und Mensch in hochgereinigter Form vor.

1955 bereits konnte daraufhin die Struktur des Schweine- und Schaf-ACTH (8, 9), 1958 die des Rinder-ACTH als einkettige Polypeptidkette aus 39 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 10 000 ermittelt werden (Abb. 1).

Abb. 1 Strukturunterschiede zwischen ACTH-Molekülen aus Rinder-, Schafs- und Schweinehypophysen



Identische Struktur der Peptidkette von Position 1 - 24 und 34 - 39

Artspezifische Sequenz der Positionen 25 - 33

[Hatched box] Schwein [Diagonal lines] Schaf [White box] Rind

(Aus C.H. LI, Wachstumshormon und ACTH, Med. Prisma 5, 13 (1965))

Es zeigte sich eine identische Struktur der Peptidkette von Position 1 - 24. Die Entfernung der offenbar teilweise artspezifischen, C-terminalen Sequenz der Positionen 25 - 39 hatte keine Beeinträchtigung der adrenocorticotropen Aktivität zur Folge. Diese Feststellung und die Beobachtung, daß eine fermentative Abspaltung oder Oxydation des N-terminalen Serinrestes zu einem fast vollständigen Aktivitätsverlust führte, legte den Schluß nahe, daß die adrenocorticotrope Wirksamkeit des ACTH in dessen N-terminalen Anteil lokalisiert ist (10, 11, 12, 13).

Diese Vermutung wurde durch die im Jahre 1960 gelungene Synthese eines Nonadecapeptids mit der Struktur der ersten 19 Aminosäuren des nativen ACTH und adrenocorticotroper Wirkung durch LI und Mitarbeiter untermauert (14). 1961 gelang SCHWYZER u. a. die Synthese eines β^{1-24} Corticotropins (15, 16) und schließlich 1963 des vollständigen, 39 Aminosäuren enthaltenden ACTH (17).

Angesichts dieser erfolgreichen Bemühungen um die Aufklärung der Struktur und die Synthese des Hormons erscheint es umso erstaunlicher, daß eine hinreichend zuverlässige, quantitative Bestimmung des ACTH im menschlichen Plasma auch heute noch auf außerordentliche Schwierigkeiten stößt.

Der Versuch einer quantitativen Bestimmung auf rein chemischem Wege kann aus zwei Gründen nicht zum Erfolg führen: Einmal stehen dafür im menschlichen Plasma nur minimale Substanzmengen zur Verfügung. Geht man von der begründeten Annahme aus, daß der normale ACTH-Spiegel im menschlichen Plasma unter 0,01 mE pro ml liegt, so wären - in Gewichtseinheiten umgerechnet - größenordnungsmäßig 10^{-10} g ACTH/ml Plasma quantitativ zu bestimmen. Zum Zweiten besitzt, wie bereits erwähnt, nicht nur das vollständige ACTH-Molekül eine adrenocorticotrope Wirkung, sondern auch verschiedenartige Bruchstücke desselben. Es liegt auf der Hand, daß eine Erfassung aller dieser Bruchstücke beispielsweise durch Chromatographie und chemische Bestimmung sowohl außerordentlich aufwendig sein müßte, als auch die eigentliche Fragestellung, nämlich die Größe der biologischen Aktivität des zu bestimmenden Substrates, nicht beantworten könnte.

Zur biologischen Bestimmung des ACTH kann man prinzipiell alle bekannten biologischen Effekte desselben heranziehen. Es sei jedoch daran erinnert, daß beispielsweise einige extraadrenale Wirkungen wie Lipolyse und Melanocytenstimulation von anderen Strukturbestandteilen abhängig zu sein scheinen, als manche der Effekte auf die Nebennierenrinde. So haben z. B. kurzkettige, N-terminale Fragmente durch-

aus eine melanocytenstimulierende Wirkung, bewirken jedoch keinerlei Steigerung der Corticoidinkretion aus der Nebenniere (18). Von den Effekten des ACTH auf die Nebennierenrinde, die ja auch im Vordergrund des klinischen Interesses stehen, hat man vor allem zwei zur quantitativen Bestimmung herangezogen, und zwar den Ascorbinsäureschwund aus der Nebenniere (nach SAYERS) (19) bzw. den Ascorbinsäureanstieg im Nebennierenvenenblut hypophysektomierter Ratten (nach MUNSON) (20) und die Steigerung der Corticoidsynthese in der Nebennierenrinde in vitro (nach SAFFRAN-SHALLY) (21) bzw. den Anstieg des Corticosterons im Nebennierenvenenblut hypophysektomierter Tiere, z.B. bei der Ratte (nach LIPSCOMB-NELSON) (22). Wir haben wegen ihrer optimalen Sensibilität im Prinzip die letztgenannte Methode in einer Modifikation von VANCE und GIRARD (23) mit anschließender fluorimetrischer Bestimmung des Corticosterons nach ZENKER und BERNSTEIN (24) benutzt.

In der Literatur beschriebene Anreicherungsverfahren für ACTH aus dem menschlichen Plasma sind mit einer von etwa 44 % - 124 % (25-29) schwankenden Ausbeute belastet, die bei der ohnehin erheblichen Fehlerbreite der biologischen Bestimmung noch erschwerend ins Gewicht fällt.

Erwähnt seien in diesem Zusammenhang neuere Untersuchungen über eine radio-immunologische Bestimmungsmethode (30-32), die sehr gute Ergebnisse, besonders hinsichtlich der Sensibilität, zu liefern scheint. Allerdings lag dabei zunächst der normale ACTH-Spiegel im Plasma um etwa drei Zehnerpotenzen über dem bisher angenommenen Wert (31). Außerdem geben auch biologisch inaktive Bruchstücke des ACTH eine immunologische Reaktion mit dem benutzten Antikörper (32).

Aufgabe dieser Arbeit war es, die in der Literatur angegebenen biologischen Bestimmungsmethoden für ACTH auf ihre Empfindlichkeit und Genauigkeit zu überprüfen. Mit Hilfe der von uns benutzten Methode sollten außerdem die ACTH-Mengen im Plasma von Gesunden und von

Patienten mit endokrinen Erkrankungen gemessen werden.

Es war naheliegend zu versuchen, die mangelhafte Sensibilität biologischer Methoden, die eine sichere Erfassung von ACTH-Normalspiegeln nicht gestattet, dadurch auszugleichen, daß man das ACTH nicht aus dem Blut einer peripheren Vene nach Passage des gesamten arteriellen und kapillären Anteils des Kreislaufes bestimmte, sondern zu diesem Zweck das Blut an einem Ort höchstmöglicher ACTH-Konzentration im Plasma entnahm. Es bot sich dazu der Bulbus cranialis venae jugularis an, der einerseits praktisch den gesamten venösen Abfluß aus der Hypophyse aufnimmt und andererseits mittels einer relativ einfachen und ungefährlichen Technik zu punktieren ist (33, 34). Es galt zu prüfen, ob die klinische Diagnostik durch dieses Verfahren zu verbessern wäre.

METHODEN

1) Parapharyngeale Hypophysektomie bei Ratten

Die Hypophysektomie der Ratten wurde im wesentlichen nach der im Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden (ABDERHALDEN) von FREUD (35) beschriebenen parapharyngealen Methode durchgeführt. An Instrumenten wurden dabei verwendet:

- a) Binocularmikroskop (Fa. Leitz, Wetzlar) mit 10-facher Vergrößerung, ca. 8 cm Objekt-Objektivabstand und direkter Beleuchtung durch eine neben dem Objektiv angebrachte, zu fokussierende Lichtquelle.
- b) Korkplatte mit Einrichtung zum Fixieren des Kopfes mittels einer um die vorderen beiden Schneidezähne der auf dem Rücken liegenden Ratte geführten Schnur.
- c) System Wasserstrahlpumpe - Gummischlauch - Saugflasche - Polyäthylen- oder Gummischlauch - rechtwinklig gebogene Glas-kanüle, deren äußerer Durchmesser am freien Ende etwa 1 mm betragen sollte (bei FREUD 0,4 - 0,7 mm). Der kürzere freie Schenkel sollte wenigstens 3 cm lang sein.
- d) Mit Wasser gefüllter Becher zum Durchspülen der Kanüle.
- e) Eine mittelgroße Schere mit spitzer und stumpfer Branche.
- f) Eine mittelgroße anatomische Pinzette
Eine mittelgroße gebogene Pinzette
Eine mittelgroße spitze Pinzette
- g) Eine S-förmig gebogene stumpfe Sonde
- h) Ein Stuhlhäkchen
- i) Ein zahnärztlicher Kugelbohrer Nr. 6 oder Nr. 8.
Ein zahnärztlicher Kugelbohrer Nr. 2 oder Nr. 3.
- k) Michelklammern 14 x 3 mm
- l) Mischung von Bienenwachs und flüssigem Paraffin im Verhältnis 3:1.
- m) 2,5%ige Avertinlösung, hergestellt entweder durch Auflösen ent-

sprechender Mengen Tribromaethanol in 0,9%iger Kochsalzlösung oder durch Auflösen von Avertin^R (Fa. Bayer, Leverkusen) (= Tribromaethanol gelöst in Amylenhydrat) in destilliertem Wasser.

- n) 2ml-Spritze mit Kanüle
- o) Gummiballon mit einem Ventil an einem Ende und einer Öffnung am anderen, die geeignet ist, die Nase der Ratte aufzunehmen, zur künstlichen Beatmung.

Alle Untersuchungen wurden an männlichen Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht von 190 - 230 g (Fa. Gassner, Ottobrunn b. München) durchgeführt.

Zur Narkose wurden während eines kurzen Aetherrausches 0,8 ml der 2,5%igen Avertinlösung pro 100 g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Man erreicht damit ein von der 3. - 25. (30.) Minute post injectionem andauerndes Toleranzstadium. Bei verminderter Empfindlichkeit der Ratte kann man ein Viertel der ursprünglichen Dosis nachspritzen. Die Ratte wurde nach Erreichen des Toleranzstadiums, mit der Nase zum Operateur gerichtet und mit dem Rücken auf der Korkplatte liegend, aufgelegt.

Sodann wurde mit der Schere ein sagittal-paramedian verlaufender Hautschnitt von einem halben Zentimeter unterhalb der Unterlippe bis zur Mitte des Abstandes zwischen Kehlkopf und dem oberen Rand des Brustbeins geführt. Ein vorheriges Entfernen der Haare ist nicht notwendig. Anschließend wurden die oberflächlichen Halsfaszien in der Medianlinie stumpf eröffnet bis zur Darstellung des linken Musculus digastricus, der im Bereich seines Sehnen spiegels einen nach lateral offenen Winkel bildet (Abb.2). Lateral von dieser Sehne wurde mit der stumpfen, gebogenen Sonde und einer spitzen Pinzette zwischen Ductus submaxillaris, Maxillargefäßen und Nerven (N. hypoglossus) in die Tiefe gegangen, wobei der M. omohyoideus median, der M. masseter lateral zu liegen kam. Das Vordringen

in die Tiefe in streng sagittaler Richtung und die Einsicht in das Operationsfeld erfolgte durch Ziehen in cranio-caudaler und geringes Spreizen in frontaler Richtung, bis in der Tiefe der Processus mesopterygoideus, ein weißer Knorpelhöcker, sichtbar wurde (Abb. 3).

Abb. 2 + 3 Hypophysektomie von Ratten auf dem parapharyngealen Weg



Situs nach Eröffnung der Halsfaszien.
Eingehen bei der Pfeilspitze lateral
vom Sehnenspiegel des M. digastricus

Processus mesopterygoideus dargestellt

Von dort aus wurde nach Ersetzen der spitzen durch eine gebogene, stumpfe Pinzette an einer Stelle, die etwa $1\frac{1}{2}$ mal die Breite des Proc. mesopterygoideus in medianer und 1 mal in caudaler Richtung von der Spitze des Knorpelhöckers entfernt liegt, mit der gebogenen Sonde die Muskulatur bis auf die Unterseite der knöchernen Schädelbasis durchbohrt und auf dem Knochen weiter bis zum Schnittpunkt der bläulichen Synchrondrosis sphenoccipitalis mit einer von Foramen occipitale magnum genau medial zur Synchrondrose verlaufenden Knochenleiste vorgedrungen. Sodann wurde cranial der Synchrondrose unter sorgfältigem Abschieben der Nasenschleimhaut der Knochen in einer der Größe des später entstehenden Bohrloches entsprechenden Ausdehnung freigelegt (Abb. 4).



Abb. 4

Hypophysektomie von
Ratten auf dem para-
pharyngealen Weg

Bohrfeld an der unteren
Schädelbasis. Synchron-
drosis sphenoccipita-
lis und Crista sind zu
erkennen. Unterhalb
der Synchrondrose ist
zur Verdeutlichung der
anatomischen Verhält-
nisse weiter als notwen-
dig freipräpariert.

Die Nasenhöhle soll bei diesen Manipulationen uneröffnet bleiben, um eine unbehinderte Nasenatmung des Tieres zu gewährleisten.

Streng medial und nasal der Synchronrose, die eben noch tangiert werden darf, wurde dann der Knochen zunächst mit einem Kugelbohrer Nr. 2 oder 3 angebohrt und schließlich mit einem größeren der Nr. 6 oder 8 bis auf die Dura mater basalis durchbohrt (Abb. 5)

Abb. 5 + 6 Hypophysektomie von Ratten auf dem parapharyngealen Weg



Bohrloch bis auf die Dura mater
basalis



Hypophyse nach Aufreissen der Dura
mater herausgesaugt

Wir haben im Gegensatz zu der von FREUD (35) angegebenen Methode die Lamina interna mit durchbohrt, da sonst deren Abtragen bis zum Rand des Loches oftmals Schwierigkeiten machte. Der Zeitpunkt des Auftreffens auf die Dura mater basalis ist bei einiger Übung relativ einfach an dem Nachlassen des Widerstandes zu erkennen. Zwischenzeitlich wurden die beim Eindringen des Bohrers eröffneten Markräume des Sphenoids mit kleinen Kügelchen der Paraffin-Wachs-Mischung abgedichtet. Die freigelegte Dura mater basalis wurde sodann möglichst in ganzer Ausdehnung des Bohrloches mit einem scharfen Stuhlhäkchen aufgerissen. Durch Aufsetzen der Saugkanüle ließ sich nun die Hypophyse bei mäßigem Sog in ein oder zwei Portionen herausaugen (Abb. 6). Dabei ist auf die Erhaltung der die Hypophyse nach oben zu abgrenzenden Membran zu achten.

Für das Verschließen der Hautwunde genügten bei der kurzen Überlebenszeit der Tiere zwei Michelklammern. Bei längerer Überlebensdauer empfiehlt sich eine zusätzliche Fasziennaht.

Im Anschluß an den Eingriff sollten die Ratten bei 28 - 35°C Außentemperatur gehalten werden. Wegen des Diabetes insipidus ist für ausreichende Deckung des vermehrten Flüssigkeitsbedarfes zu sorgen.

Bei tiefer Narkose oder längerer Dauer der einzelnen Manipulationen empfiehlt es sich, in kurzen Abständen alle Instrumente aus dem Operationsgebiet zurückzuziehen, um einem Atemstillstand vorzubeugen. Sollte dieser trotzdem auftreten, so ist er durch Beatmen mit dem oben beschriebenen Gummiball im allgemeinen binnen kurzer Zeit zu beheben. Der Vorteil der kurzdauernden Avertinnarkose, aus der die Ratte etwa 45 - 60 Minuten nach Narkosebeginn spontan wieder erwacht, liegt in der geringen Narkosebelastung und in der Möglichkeit der spontanen Reinigung der Atemwege nach der Hypophysektomie.

Die Kontrolle der Hypophysektomie auf Vollständigkeit erfolgte nach Aufklappen des Schädeldaches vom Foramen occipitale magnum aus durch Aufsicht auf die Schädelbasis von oben (Abb. 7a, 7b).

Abb. 7 Hypophysektomie bei Ratten auf dem parapharyngealen Weg.
Kontrolle der Hypophysektomie auf Vollständigkeit.



Abb. 7a Schädelbasis von oben:
Hypophyse in situ



Abb. 7b Schädelbasis von oben:
Hypophyse entfernt. Die
zeltförmige, die Hypophyse
nach oben zu abgrenzende
Membrana tectoria ist
deutlich zu erkennen.

Einen orientierenden Überblick über Lage und topographische Beziehungen der Hypophyse bietet Abb. 8

Abb. 8 Sagittalschnitt durch den Schädel einer Ratte



(Aus Cragie's Neuroanatomy of the Rat, Academic Rev. N.Y. and London 1953)

Anmerkung: Vergrößerung von Abb. 2, 7a. 7b etwa 5-fach,
von Abb. 3 - 6 etwa 15-fach.

2) Gefäßkatheter bei der Ratte

Zur Kanülierung wurden die Ratten mit subcutan injiziertem 10%igem Urethan (Fa. Merck 8490) in Dosen von 1,2 ml pro 100 g Körpergewicht renarkotisiert. Eine 10%ige wässrige Lösung von Urethan (Molekulargewicht 118) ist gegenüber den Körperflüssigkeiten ungefähr 6-fach hypertonisch, was bei subcutaner Injektion unter die Rückenhaut jedoch lediglich zu einer unbedenklichen lokalen Reaktion führte. Vom Zeitpunkt der Injektion bis zum Eintritt des Toleranzstadiums vergehen etwa 20 - 30 Minuten. Man kann diese Zeitspanne auf 2 - 3 Minuten verkürzen, wenn man statt der vollen Urethandosis nur etwa 5/6 davon subcutan und gleichzeitig 1/4 der für die Hypophysektomie angegebenen Avertinmenge intraperitoneal injiziert. Das Toleranzstadium erstreckt sich in jedem Fall über mehrere Stunden.

Die folgende Praeparation des Gefäß-Nervenbündels in der li. Fossa inguinalis begann mit einem 2 cm langen Hautschnitt in der Verlaufsrichtung des Leistenbandes. Eventuell vorhandenes subcutanes Fettgewebe wurde mit der Schere durchtrennt, die Faszien wurden mit zwei Pinzetten stumpf eröffnet. Arteria und Vena femoralis wurden dann in einer Ausdehnung von 1/2 bis 1 cm distal vom Leistenband mit einer stumpfen gebogenen und einer spitzen Pinzette einzeln freipraepariert und von perivasculärem Gewebe gesäubert. Anschließend wurde die Vena femoralis in der rechten Leistengrube in gleicher Weise dargestellt. Die Vv. femorales dext. et sin. und die A. femoralis sin. wurden dann mit je zwei gezwirnten Seidenfäden (Vömel Nr. 0) unterfahren. Es ist dabei darauf zu achten, daß zwischen der proximalen und der distalen Ligatur kein weiteres Gefäß in die Venen einmündet bzw. die Arterie verläßt, weil sonst nach dem Einschieben der Katheter daraus eine durch das Zuziehen der Ligaturen nicht zu behebende Blutung entsteht.

Es hat sich bei uns bewährt, die Kanülierung mit dem arteriellen Katheter zu beginnen. Es wurde zunächst die distale Ligatur der A. femoralis sin. geknüpft und zugezogen. Mit einer spitzen Stahlkanüle wurde dann die obenliegende Wand der Arterie in deren Verlaufsrichtung durchbohrt, während das Gefäß an der distalen Ligatur nach caudal und an der proximalen nach oben gezogen und damit abgeknickt wurde, was eine Blutung nach dem Eröffnen verhindert. Unter fortbestehendem Zug an den Unterbindungsfäden wurde nun ein Gefäßkatheter Größe 0 R (äußerer Durchmesser 0,46 mm, Fa. Braun, Melsungen), der vorher auf eine Länge von ca. 20 cm gekürzt und dessen Spitze mit einer Rasierklinge nahezu rechtwinklig abgeschnitten worden war, in die Arterie eingeführt und 7 cm weit bis zu einer vorher angebrachten Marke vorgeschoben. Es erwies sich als zweckmäßig, den Katheter durch einen als Mandrin benutzten dünnen Kupferdraht zu versteifen, was das Einführen in die Arterie erleichtert. Sobald man beim Verschieben einen Widerstand bemerkt, kann der Draht entfernt und der Katheter mit wenig Heparinlösung (Vetren^R, Fa. Promonta, Hamburg) durchgespritzt werden, wodurch die weitere Passage im allgemeinen wieder ermöglicht wird. Nach Setzen der proximalen Ligatur wurden zum Abschluß der arteriellen Kanülierung durch den Katheter ungefähr 0,5 ml Vetren^R, entsprechend 50 I.E. Heparin, appliziert. Die Spritze mußte im Anschluß daran im Ansatzstück des Katheters verbleiben, um ein Ausfließen des unter arteriellem Druck stehenden Blutes zu verhindern. Mit einer intravasalen Katheterlänge von 7 cm befindet sich die Spitze desselben bei Ratten von 200 g Körpergewicht etwa 1 cm oberhalb des Hiatus aorticus diaphragmatis, das heißt sicher oberhalb des Abganges der drei die Nebenniere versorgenden Arterien (36).

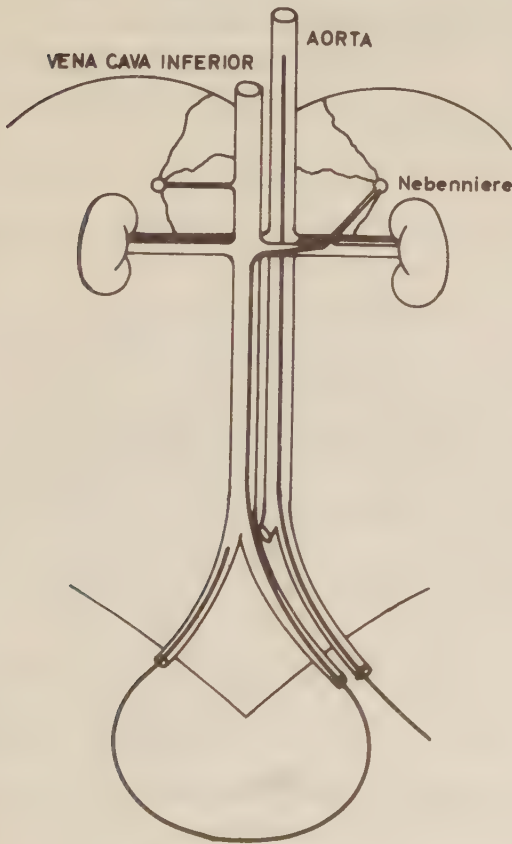
(NB. Im folgenden soll die Applikation von ACTH oder Plasma durch einen in der eben beschriebenen Weise eingeführten Katheter einfach als "intraarterielle Applikation" bezeichnet werden, ohne näher auf die Lage des Katheters einzugehen.)

Vor der Einführung des Nebennierenvenenkatheters in die linke V. femoralis wurde zunächst auch hier die distale Ligatur geknüpft und zugezogen. Dann wurde mit der fein angespitzten Branche einer kleinen Schere ein längsverlaufender Schlitz in die obenliegende Venenwand gemacht, durch den unter ständigem Zug an der distalen Unterbindung ein Clay-Adams-Katheter PE 10 mit 0,61 mm äußerem Durchmesser (Fa. Vogel, Gießen) etwa 5 cm weit vorgeschoben wurde. Der Katheter war vorher auf eine Länge von 10 - 12 cm gebracht und an der Spitze mit einem Rasiermesser in nahezu rechtem Winkel abgeschnitten worden, um Gefäßwandverletzungen zu vermeiden. Nach Zuziehen der proximalen Ligatur über dem Katheter und Durchspritzen desselben mit 0,2 - 0,3 ml Vetren^R wurde bei der folgenden Kanülierung der rechten V. femoralis in gleicher Weise verfahren. Als Katheter verwandten wir hier einen nach der Spitze zu kleinkalibriger werdenden Polyvinylchloridschlauch, dessen innerer Durchmesser am distalen Ende dem äußeren des Clay-Adams-Katheters PE 10 entsprach. Die Herstellung jenes Katheters geschah durch Ausziehen eines Polyvinylchloridschlauches von etwa 2 mm Durchmesser über kleiner Gasflamme. Nach Verschieben dieses Katheters um 2 - 3 cm bis in die V. iliaca communis und Durchspritzen mit Vetren^R wurden die distalen Enden der beiden venösen Katheter durch Zusammenstecken vereinigt. Insgesamt sollen nach Abschluß der Kanülierung 50 I. E. Heparin pro 100 g Körpergewicht der Ratte, das entspricht 0,5 ml Vetren^R/100 g Körpergewicht, appliziert worden sein.

Die anschließende Laparotomie erfolgte entlang der Linea alba, beginnend etwa 1 cm cranial der Symphyse bis zum Processus ensiformis sterni. Alle nicht retroperitoneal fixierten Eingeweide der linken Bauchhöhle, einschließlich Magen und Milz, wurden sodann nach rechts aus dem Abdomen auf eine mit warmer physiologischer Kochsalzlösung befeuchtete Zellstofflage herausgewälzt und abgedeckt. Nach Aufsuchen der Katheterspitze in der V. cava inferior

wurde diese mit einer gebogenen stumpfen Pinzette über die linke Nierenvene in die linke Nebennierenvene dirigiert, wobei der Katheter vom distalen Ende in der linken Leistengrube aus vorgeschoben wurde, bis er mit der Spitze das Lumen der Nebennierenvene vollständig ausfüllte und somit steckenblieb.

Abb. 9 Schematische Darstellung der Lage der Katheter nach Abschluß der Kanülierung, in Anlehnung an LIPSCOMB-NELSON (22) und VANCE-GIRARD (23)



Erklärung siehe Text

Es ist darauf zu achten, daß die Nebennierenvene nicht abgeknickt ist, wenn der Katheter seine endgültige Lage erreicht hat. In manchen Fällen noch vor der Katheterspitze in die Nebennierenvene einmündende Gefäße (V. phrenica inferior) wurden nicht ligiert. Die Eingeweide wurden nun wieder in die Bauchhöhle zurückverlagert und der klaffende Laparotomieschnitt mit einer feuchten Zellstofflage abgedeckt.

Die Lage der Katheter ist in Abb. 9 schematisch veranschaulicht.

3) Blutentnahme aus dem Nebennierenvenenkatheter

Während der an die Kanülierung sich anschließenden Phase der Blutentnahme ist darauf zu achten, daß das Tier bei optimaler Temperatur von ca. 35°C gehalten wird.

Nach Trennung der beiden Venenkatheter wurde zunächst die distale Öffnung des in der rechten V. iliaca communis liegenden Katheters mit einem passenden Drahtende verschlossen und das aus dem Nebennierenvenenkatheter fließende Blut nach Einschalten einer Stoppuhr in Wintrobe-Haematokritröhrchen aufgefangen. Die Ausübung eines Soges war nicht nötig, da der venöse Druck in der Nebennierenvene bei schlüssig der Venenwand anliegendem Katheter genügte, das Blut spontan aus dem distalen Katheterende tropfen zu lassen. Die während der einzelnen Sammelperioden aufgefangenen Blutmengen wurden in Haematokrit-Einheiten (HkE) gemessen, wobei wir eine Füllung der Röhrchen bis zur Marke 10 als 1 HkE bezeichneten, was etwa 0,75 ml entspricht. Da die Skala von 0 bis 10 durch 100 Teilstriche unterteilt ist, kann man ohne weiteres bis auf 2 Stellen hinter dem Komma ablesen, die 3. Stelle wurde jeweils auf 5 bzw. 10 aufgerundet. Nach Beendigung einer Sammelperiode wurde das gefüllte Haematokritröhrchen im Kühlschrank bei 4°C bis zur Zentrifugation nach Abschluß des laufenden Versuches aufbewahrt. Die Dauer der Blutentnahme wurde mit der Stoppuhr kontrolliert.

Nach Beendigung des gesamten Versuches wurden alle Röhrchen miteinander 15 Minuten lang bei 3500 Upm $\approx$ 1500 g zentrifugiert, im Anschluß daran die Blut- und Plasamenge eines jeden Röhrchens abgelesen, der Plasmaüberstand mit einer langen, dünnen V_2A -Kanüle in eine 1 ml-Tuberkulinspritze gesaugt und mit destilliertem Wasser auf 0,5 ml aufgefüllt. Die gesamten 0,5 ml wurden dann durch die zwischenzeitlich nicht entfernte Kanüle in ein dickwandiges Zentrifugenglas von 25 ml Fassungsvermögen gespritzt, die Tuberkulinspritze samt Kanüle mit destilliertem Wasser nochmals bis zur 0,5 ml-Marke aufgezogen und wiederum in dasselbe Zentrifugenglas entleert, so daß sich in diesem nunmehr das gesamte Plasma einer Sammelperiode - auf 1,0 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt - befand. Die Zentrifugengläser wurden mit Stopfen aus Hochdruckpolyaethylen verschlossen und in der Tiefkühltruhe bei -18°C bis zur Corticosteronbestimmung aufbewahrt.

4) Fluorimetrische Corticosteronbestimmung

Die Bestimmung wurde im Prinzip nach der von ZENKER und BERNSTEIN angegebenen Methode (24) durchgeführt. Wir änderten lediglich die angegebenen Volumina zum Zwecke der gleichzeitigen Bestimmung möglichst vieler Einzelwerte und adaptierten die Fluoreszenzmessung in der von PFEIFFER und Mitarbeitern (37) beschriebenen Weise auf das Fluoreszenzzusatzgerät des Photometer Eppendorf (Fa. Netheler + Hinz GmbH, Hamburg).

An Reagenzien wurden verwendet: Chloroform p.a. Merck, 0,1-normale Natronlauge, Aethylalkohol p.a. Merck, Schwefelsäure konzentriert p. a. Merck.

Das Fluoreszenzreagenz wurde aus 2,4 Volumeneinheiten konzentrierter Schwefelsäure und 1,0 Volumeneinheiten eines 50%igen (V/V) Aethylalkohols hergestellt. Es ist über den Zeitraum von etwa einer Woche relativ stabil, allerdings steigt die Fluoreszenz-

intensität identischer Corticosteronmengen mit zunehmendem Alter des Fluoreszenzreagenz etwas an. Diese Fehlerquelle wird jedoch durch die Erstellung von Corticosteroneichwerten bei jeder Bestimmung eliminiert.

Als Corticosteron-Stock-Standard wurden 100 mg Corticosteron (Calorganic Division of Calbiochem, Los Angeles) in 200 ml absolutem Äthylalkohol gelöst. Aus einem weiter mit Äthylalkohol verdünnten Standard von 0,5 mg/100 ml wurde der jeweilige Arbeitsstandard für die Eichwerte durch Verdünnen mit destilliertem Wasser hergestellt.

Die Reinigung der verwendeten Glaswaren erfolgte in Dichromatschwefelsäure über 12 oder mehr Stunden, nachfolgendem gründlichen Spülen mit destilliertem Wasser und Trocknen bei 80 - 100°C im Trockenschrank. Eine Reinigung mit Detergentien ist nicht vorteilhaft, da diese Stoffe selbst schwach fluoreszieren. Es ist darauf zu achten, daß die Innenwand der verwendeten Glaswaren nicht zerkratzt oder angeätzt ist.

Zur Extraktion wurden die aufgetauten Plasmaproben sowie ein Wasserwert und ein zweiter 0,2 Mikrogramm Corticosteron enthaltender Eichwert von ebenfalls 1,0 ml Volumen in 25 ml-Zentrifugengläsern mit jeweils 15 ml Chloroform aus einer Burette aufgefüllt, nach Verschließen der Zentrifugengläser mit Hochdruckpolyäthylenstopfen 15 Sekunden lang mit dem Rotamixer (Fa. Hook + Tucker Ltd) geschüttelt und 5 Minuten bei 2500 Upm = 850 x g zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde dann mit einer an die Wasserstrahlpumpe angeschlossenen spitzen Stahlkanüle abgesaugt. Zum Waschen wurden 1,5 ml 0,1 n NaOH mit einer automatischen Pipette zu dem Chloroformextrakt gegeben, ebenfalls 15 Sekunden geschüttelt und bei 2500 Upm 5 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgesaugt.

Aus dem verbleibenden Chloroformextrakt wurden in zwei 15 ml fassende Zentrifugengläser von etwa 1,5 cm innerem Durchmesser je 6 ml pipettiert und durch kräftiges Schütteln von 15 Sekunden Dauer mit je 3 ml Fluoreszenzreagenz vermischt. Da die Genauigkeit aller von uns erprobten automatischen Pipetten beim Pipettieren des etwas viskösen und spezifisch schweren Fluoreszenzreagenz zu wünschen übrig ließ, wurden die 3 ml von Hand pipettiert. Nach dem Schütteln wurde das Gemisch bei 2500 Upm 5 Minuten lang zentrifugiert und im Anschluß daran die überstehende Chloroformphase mit einer stumpfen Stahlkanüle abgesaugt. Das in den Zentrifugengläsern verbleibende Fluoreszenzreagenz blieb zwei Stunden bei Zimmertemperatur stehen und wurde dann durch einfaches Umgießen in Spiegelglasküvetten überführt. Die Glasküvetten sollten dabei wenigstens bis zu einer Höhe von 2,5 cm - das entspricht einem Volumen von 2,5 ml - gefüllt sein.

Die Messung der Fluoreszenzintensität wurde sofort nach Umfüllen aller Proben in Küvetten im Fluoreszenzzusatz zum Photometer Eppendorf vorgenommen. Wir verwendeten ein Primärfilter von 405 + 436 nm und ein Sekundärfilter von 500 - 3000 nm. Die Eichung des Gerätes erfolgte mit einem Standard für grünes Licht (No. 5816), dessen fluoreszierende Fläche durch mit Tusche geschwärztes Papier bis auf ca. 2 mm^2 abgedeckt worden war, so daß der Standardwert von 100 % Durchlässigkeit im oberen Teil des bei unseren Bestimmungen am häufigsten benutzten Meßbereiches lag.

Die gefüllten Küvetten wurden nach vollzogener Eichung des Gerätes nacheinander in den Küvettenhalter gestellt, und zwar wurde zunächst die erste Reihe der Doppelwerte, im Anschluß daran die zweite, jeweils in der Reihenfolge ihrer Verarbeitung bei der Extraktion, gemessen.

Bei der fluorimetrischen Messung mit dem Photometer Eppendorf werden aus dem Spektrum einer Lichtquelle - zum Beispiel einer Quecksilber-Hochdrucklampe (Hg₂-Spektrallampe zum Photometer

Eppendorf, Fa. Osram) - bestimmte Wellenlängen durch ein Primärfilter ausgeblendet und auf die zu messende Substanz in der Küvette geleitet. Die durch die fluoreszierende Substanz angeregte - längerwellige - Strahlung wird nach Durchgang durch das Sekundärfilter, das für die anregende Wellenlänge nicht durchgängig ist, von einem Photomultiplier aufgenommen und in einen der Lichtstärke proportionalen elektrischen Strom verwandelt. Dieser Strom wird nach Verstärkung auf der Meßskala als Maß für die Stärke der Fluoreszenz angezeigt.

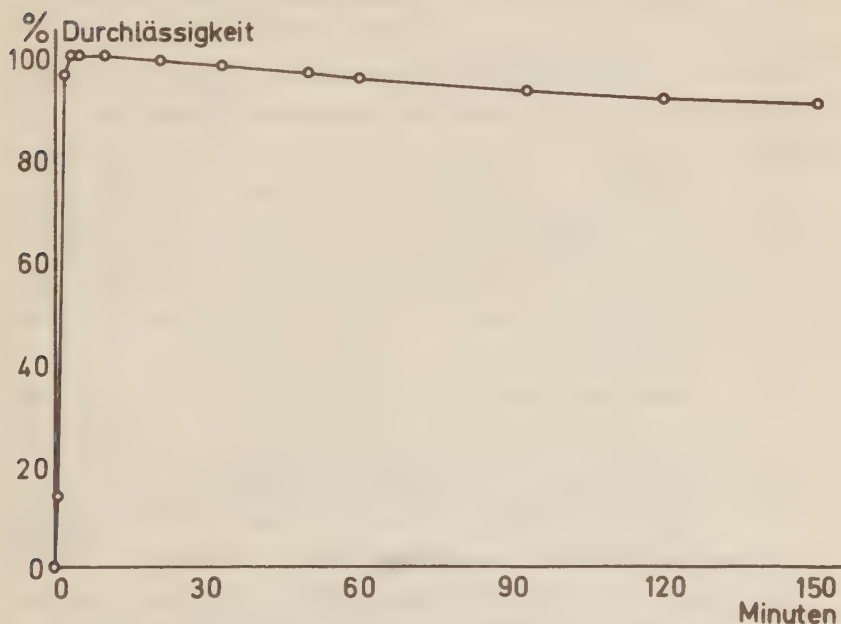
Es handelt sich bei der Fluoreszenzanalyse also um die Messung einer Lichtemission. Die entstehende Lichtmenge nimmt dabei linear mit der Anzahl der fluoreszenzanregenden Teilchen zu. Die Ablesung der Strahlungsintensität erfolgt daher auf einer linearen Skala von 0 bis 100 % Durchlässigkeit. Wird nun die Strahlungsintensität einer zu messenden Probe größer als die des Fluoreszenzstandards, dessen Strahlungsintensität definitionsgemäß 100 % beträgt, so muß zu deren Messung die Stufenschaltung des Photometers benutzt werden. Diese ist jedoch an die logarithmische Funktion der Extinktionsskala gekoppelt. Es gilt dabei $\Delta E = \log I_0/I$ (LAMBERT-BEERSche Gleichung). Bei dem geeichten Stufenschalter entspricht jede Stufe einer Extinktion von $\Delta E = 0,25$. Da $I_0 = 100\%$, gilt $100/I = 10^E$ und $I = 10^{2-E} (\%)$. Praktisch wird bei der Umrechnung so vorgegangen, daß man den Stufenschalter solange nach links dreht, bis die Lichtmarke wieder auf der Skala erscheint. Dann wird der auf der Extinktionsskala angezeigte Wert abgelesen und von $n \cdot 0,25$ subtrahiert (n = Anzahl der zurückgeschalteten Stufen). Der so erhaltene Wert wird delogarithmiert und stellt dann das Ergebnis von 10^{-E} dar. Nach Multiplikation desselben mit 100 erhält man den gesuchten Wert für die Durchlässigkeit in Prozent.

Der proportionale Zusammenhang zwischen Konzentration des fluoreszierenden Materials und der Fluoreszenzintensität gilt nur für

äußerst verdünnte Lösungen. Die sogenannte Konzentrationslöschung führt zu einer relativen Abnahme der Fluoreszenzintensität bei steigender Konzentration, so daß bei 10^{-6} c 10^{-3} die Fehlergrenze bereits größer als 1 % ist. Da wir bei unseren Versuchen weit unterhalb dieses Wertes maßen, konnte diese Fehlerquelle ohne weiteres unberücksichtigt bleiben.

Es ist darauf zu achten, daß die Messungen einer Bestimmungsreihe in einem Zeitraum von maximal 10 Minuten vorgenommen werden, um systematische Fehler durch das Meßgerät und die Meßsubstanz zu vermeiden.

Abb. 10 Änderung der Durchlässigkeitswerte einer konstant fluoreszierenden Substanz nach dem Einschalten des Photometers
Eppendorf

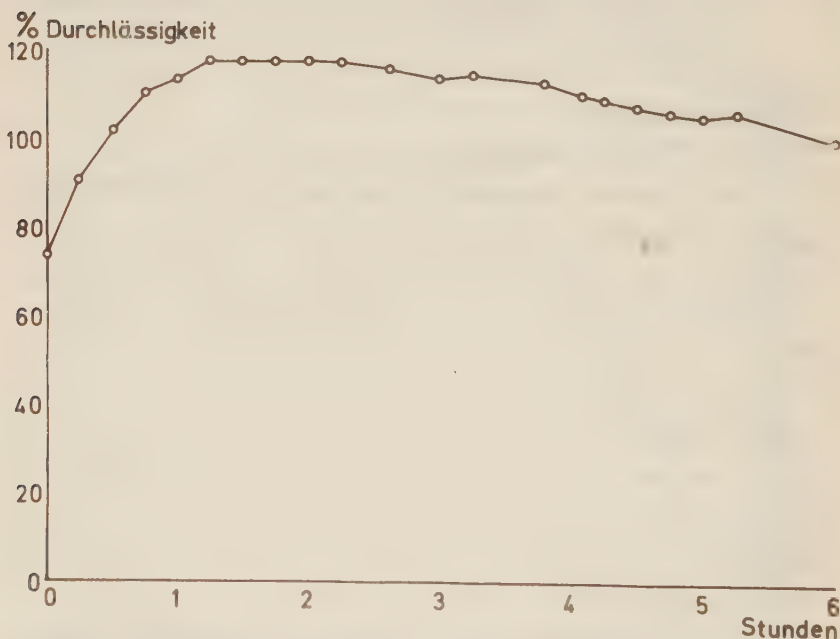


Maximale Durchlässigkeitswerte werden bereits 3 Minuten nach dem Einschalten des Gerätes erreicht. Nacheichnung ist nur bei längerer Meßdauer notwendig.

Nach Einschalten des Photometers und des Stromversorgungsgerätes steigt die Fluoreszenz einer beliebigen, im Strahlengang befindlichen, fluoreszierenden Substanz, z. B. des Fluoreszenzstandards, innerhalb von 3 Minuten bis zu einer maximalen Höhe an, um nach weiteren 10 Minuten langsam wieder abzusinken, und zwar während der ersten 3 Stunden um etwa 4 % pro Stunde, sofern man den Maximalwert mit 100 % angenommen hat (vgl. Abb. 10).

Das durch Extraktion nach der Methode von ZENKER und BERNSTEIN (24) gewonnene fluoreszierende Material erreicht maximale

Abb. 11 Änderung der Fluoreszenzintensität von 0,2 Mikrogramm Corticosteron mit der Zeit nach Beendigung der Extraktion



Maximale Fluoreszenzintensität 75 - 135 Minuten nach Beendigung der Extraktion. Der Strahlengang war zwischen den in viertelstündigen Abständen vorgenommenen Messungen jeweils geschlossen.

Fluoreszenz etwa 75 Minuten nach Beendigung des Extraktionsvorganges. Auf diesem Niveau bleibt der Wert wenigstens eine Stunde und fällt dann langsam wieder ab (vgl. Abb. 11). Es ist allerdings zu bemerken, daß wir diese Verhältnisse lediglich für die Fluoreszenz von 0,2 Mikrogramm Corticosteron nachgeprüft haben.

Die sich daraus ergebenden Meßfehler können bei Einhaltung eines Zeitraumes von 10 Minuten für die Messung einer Bestimmungsreihe ohne weiteres vernachlässigt werden.

5) ACTH - Standardlösungen

Die zur Aufstellung von ACTH-Eichkurven notwendigen ACTH-Standardlösungen wurden durch Verdünnen von einer Ampulle ACTH-Trockensubstanz CIBA-30' 920-Ba bzw. später von einer Ampulle Synacthen^R, beide je 0,25 mg β^{1-24} Corticotropin enthaltend, hergestellt. Als Lösungsmittel verwandten wir zunächst 0,001 n HCl/0,2 % Humanalbumin/ 0,9 % NaCl-Lösung, später nur 0,001 n HCl/0,9 % NaCl-Lösung, da der Zusatz von Humanalbumin, unter der Vorstellung einer Verminderung der Adsorption des ACTH an die Glasoberfläche zugesetzt, keine ersichtlichen Vorteile brachte (38). Wir gingen beim Verdünnen so vor, daß wir im Kühlraum bei + 2°C den gesamten Ampulleninhalt von 0,25 mg ACTH-Trockensubstanz, entsprechend etwa 25 Einheiten ACTH, der mitsamt den zertrümmerten Glaspartikeln der Ampulle in einen Erlmeyerkolben verbracht worden war, in 25 ml des Lösungsmittels auflösten. Diese Lösung, 0,1 mg β^{1-24} Corticotropin/ml enthaltend, wurde nun successive bis zu den gewünschten Konzentrationen weiterverdünnt. Von jeder dieser Eichlösungen wurden mehrere Proben von 2 - 3 ml in kleine Glasreagenzgläser gegeben und sofort in der Kühltruhe bei - 18°C eingefroren. Die Aufbewahrung der Eichproben bei + 2°C statt im eingefrorenen Zustand brachte hinsichtlich des Aktivitätsverlustes der Proben keine Vorteile.

Die ACTH-Eichlösungen wurden jeweils für einen Zeitraum von höchstens drei Tagen hergestellt, so daß die Plasmawerte eines

Patienten mit den aus einer Verdünnungsreihe stammenden ACTH-Eichwerten verglichen werden konnten und andererseits der nachweislich eintretende Aktivitätsverlust der eingefroren aufgehobenen Standardlösungen nicht allzusehr ins Gewicht fiel. Die ACTH-Verdünnung wurde im übrigen stets zur Zeit der Plasmagewinnung vorgenommen, wodurch bei dem gleichfalls zu beobachtenden Aktivitätsverlust der eingefrorenen Plasmaproben die daraus resultierende Fehlermöglichkeit relativ klein gehalten werden konnte.

Die biologische Aktivität des β^{1-24} Corticotropin wird mit 100 - 110 E/ml angegeben (15-17, 39-42). Im folgenden geschehen die Angaben von ACTH-Mengen in internationalen Einheiten statt in Milligramm, da dies den Vergleich mit den Werten anderer Autoren erleichtert (22, 23, 25-29, 37, 43-47). Die Umrechnung erfolgte nach $0,01 \text{ mg} = 1 \text{ E} = 1000 \text{ mE}$.

6) Punktion des Bulbus cranialis venae jugularis beim Menschen

Die Gewinnung des zu untersuchenden menschlichen Plasmas erfolgte durch Punktion des Bulbus cranialis venae jugularis einer Seite und einer Cubitalvene (Untersuchungen mit P. DIETERLE) (48, 49). Die Punktion des Bulbus wurde in Lokalanaesthesie bei seitlich gelagertem Kopf und leicht angezogenem Kinn des Patienten durchgeführt. Eine Stahlkanüle mit Mandrin von ca. 6 cm Länge wurde am vorderen Rand des Musculus sternocleidomastoideus etwa 1 cm unterhalb des Processus mastoideus mit einer Neigung von etwa 40 Grad zur Halsebene eingestochen und zwischen Processus mastoideus und Processus styloideus in Richtung auf den Bulbus vorgeschoben. Die Technik ist aus den Untersuchungen über die Hirndurchblutung bekannt (33, 34). Das Eindringen der Nadel in den Bulbus kann der Erfahrene recht genau spüren. Ein weiteres Vorschieben der Nadel ist dann wegen des Widerstandes der knöchernen Schädelbasis nicht mehr möglich. Das Novocaindepot oder ein selten auftretendes kleines Haematom im Bulbusbereich kann eine flüchtige Parese des Nervus facialis und des Nervus hypoglossus zur Folge haben, bleibende Schäden wurden jedoch nicht beobachtet.

Über den Bulbus venae jugularis erfolgt bekanntlich der Blutabfluß aus den venösen Sinus des Gehirns. Dabei spielen direkt an der Schädelbasis Zuflüsse extracerebraler Venen keine wesentliche Rolle (50). Da das venöse Blut der Hypophyse über eine Anzahl von Venen in den Sinus cavernosus gelangt, fließt über den Bulbus cranialis venae jugularis einer Seite annähernd die Hälfte des vom Hypophysenvorderlappen abgegebenen ACTH's ab, wenngleich zu bemerken ist, daß der Abfluß nicht immer seitengleich ausgebildet ist (50, 51).

15 Minuten nach der Punktion des Bulbus wurde eine Cubitalvene punktiert und gleichzeitig aus beiden Kanülen je 20 ml Blut in eine Glasspritze aspiriert, deren Innenwand mit Heparin (Liquemin^R) benetzt war. Unmittelbar im Anschluß daran wurde das Blut in Polyamid-Zentrifugenbecher von 10 ml Fassungsvermögen mit Lupolentopfen auf Eis gebracht und sofort in einer Kühlzentrifuge bei + 4°C 10 Minuten lang mit 3500 Upm = 1500 x g zentrifugiert. Das so erhaltene Plasma wurde dann im Kühlraum in einzelnen Volumina von jeweils 1,6 ml in kleine Reagenzgläser aufgeteilt und in der Kühltruhe bei - 18°C eingefroren. Im Anschluß an die erste Blutentnahme wurden dem Patienten 4 mg Dexamethason (Dexa-Scheroson^R, Schering AG, Berlin) in ca. 100 ml 5%iger Laevuloselösung innerhalb von 3 - 4 Minuten intravenös infundiert. Eine Stunde nach Beginn der Dexamethasoninfusion wurden nochmals 20 ml Blut aus der noch im Bulbus cranialis venae jugularis liegenden Kanüle in der oben beschriebenen Weise gewonnen, zentrifugiert und das Plasma eingefroren.

7) ACTH - Bestimmung

Die Applikation des Plasmas bzw. der ACTH-Eichlösungen zur biologischen Bestimmung der ACTH-Aktivität erfolgte über den in der Aorta abdominalis bzw. Aorta thoracica liegenden Katheter mittels des Dauerinfusionsgerätes PERFUSOR (Fa. Braun, Melsungen), das bei Stufe 8 und Verwendung einer 10 ml-Spritze die Applikation von 1 ml Flüssigkeit innerhalb von 93,8 Sekunden gestattet. Bevor

uns dieses Infusionsgerät zur Verfügung stand, benutzten wir eine Tuberkulinspritze mit 1 ml Volumen und applizierten die zu testende Substanz innerhalb einer Minute. In beiden Fällen war die Applikationszeit sicher größer als die Kreislaufzeit der Ratte.

Bei der Bestimmung des ACTH-Gehaltes des zu untersuchenden Plasmas gingen wir so vor, daß wir ca. 90 Minuten nach beendeter Hypophysektomie wie oben beschrieben 4 Minuten lang Blut aus dem Nebennierenvenenkatheter in einem Haematokritröhrchen sammeln. Im Anschluß daran wurde 1 ml einer 0,05 mE (=Milli-Einheiten) pro Milliliter enthaltenden Eichlösung, die unmittelbar vorher innerhalb 1 - 2 Minuten mit heißem Wasser aufgetaut worden war, in 94 Sekunden mit dem PERFUSOR durch den arteriellen Katheter infundiert. Genau 3 Minuten nach Beginn dieser Infusion wurde aus dem Nebennierenvenenkatheter, der, um einen venösen Rückstau in der Nebennierenvene auf jeden Fall zu vermeiden, nach der ersten 4-Minuten-Sammelperiode nicht wieder mit dem in der rechten V. femoralis liegenden Katheter zusammengesteckt worden war, erneut Blut gesammelt, diesmal 8 Minuten lang, d.h. also von der 3. - 11. Minute nach Beginn der ACTH-Applikation. (In früheren Stadien unserer Versuche hatten wir 20 Minuten vor der Infusion der Eichdosis von 0,05 mE noch 0,01 mE in 1 ml Lösungsmittel gegeben und das Nebennierenvenenblut in gleicher Weise gesammelt. Wir sind davon wieder abgekommen, weil ein Corticosteronanstieg auf 0,01 mE als erster Dosis in den meisten Fällen nicht erkennbar war und weil bei der um 20 Minuten verlängerten Versuchsdauer manche Ratten kurz vor Beendigung des Versuches ad exitum kamen.) Nach Abschluß der zweiten Sammelperiode wurden die distalen Enden der beiden venösen Katheter wieder zusammengesteckt, so daß das unter geringem Druck aus dem Nebennierenvenenkatheter austretende Blut über die Vena iliaca communis wieder in das Gefäßsystem gelangte (Abb. 9). 20 Minuten nach Beginn der ersten ACTH-Applikation wurden die beiden venösen Katheter wieder getrennt, der in der

rechten V. femoralis liegende Katheter verschlossen und aus dem Nebennierenvenenkatheter wiederum 4 Minuten lang Blut gesammelt. Im Anschluß daran wurde 1 ml des zu untersuchenden Plasmas in gleicher Weise wie die Eichlösung injiziert und weitere 3 Minuten nach Beginn dieser Infusion erneut mit dem Blutsammeln bis zur 11. Minute post infusionem begonnen.

Nach Beendigung dieser Sammelperiode wurde das Tier durch Urethan oder Avertin^R i.v. getötet, die richtige Lage der Katheter durch Inspektion kontrolliert und die Hypophysektomie nach Eröffnen des Gehirnschädels von Foramen occipitale magnum aus auf ihre Vollständigkeit untersucht (Abb. 7a, 7b).

Zusammengefaßt sieht das zeitliche Schema für die ACTH-Bestimmung also wie folgt aus:

0 Minuten nach beendeter Hypophysektomie:

- | | |
|--------------|---|
| 0.-4. Minute | Nebennierenvenenblut sammeln = Kontrolle der Basalinkretion |
| 4.-5. min | 34sec Infusion der ACTH-Eichlösung von 0,05 mE |
| 7.-15. min | Nebennierenvenenblut sammeln = Meßperiode für Standard |
| 17.-28. min | Nebennierenvenenblut sammeln = Kontrolle für Basalinkretion |
| 28.-29. min | 34sec Infusion von 1 ml Plasma |
| 29.-39. min | Nebennierenvenenblut sammeln = Meßperiode für Plasma |

Es sei noch bemerkt, daß die im arteriellen Katheter nach der Infusion verbleibende Flüssigkeitsmenge (=Totvolumen) von weniger als 0,01 ml bei den von uns verwandten ACTH-Aktivitäten keine Fehlerquelle darstellt.

8) Fluorimetrische Bestimmung der sogenannten "11-Hydroxycorticoide" im Plasma

Außer den ACTH-Spiegeln bestimmten wir im menschlichen Plasma auch die sog. "11-Hydroxycorticoide"* nach der von DE MOOR, STEENO, RASKIN und HENDRIKX 1960 (52) erstmals angegebenen und von MATTINGLY und Mitarbeitern (53) modifizierten Methode, die von den aus der menschlichen Nebennierenrinde sezernierten Steroiden hauptsächlich das Cortisol und das Corticosteron erfaßt (Versuche mit M. MÜLLER - BARDORFF und W. HOCHHEUSER) (48, 49, 54). Nach den Angaben von MATTINGLY und Mitarbeitern ist die Fluoreszenzintensität von Corticosteron 2, 52 mal so groß wie die einer gleichgroßen Menge von Cortisol, während das von uns zur ACTH-Suppression verwendete Dexamethason keine Fluoreszenz zeigt. Es werden folgende Reagenzien verwendet: Methylenchlorid p. a. Merck, konzentrierte Schwefelsäure p. a. Merck, 1 n NaOH aus Natriumhydroxyd in Plätzchenform reinst (Merck), Aethylalkohol absolut p. a. Merck.

Im Gegensatz zu den Angaben von MATTINGLY nahmen wir keine Reinigung des Methylenchlorids vor. Wir haben keine Veränderung der Leerwerte bei Verbrauch einer Literflasche Methylenchlorid innerhalb von 4 - 5 Tagen beobachtet. Das Fluoreszenzreagenz bestand aus 7 Teilen konzentrierter Schwefelsäure und 3 Teilen absoluten Aethylalkohols. Die farblose Lösung war bei Zimmertemperatur stabil, wenngleich ein allmählicher Anstieg der Fluoreszenz-leerwerte mit zunehmendem Alter des Fluoreszenzreagenz festzustellen war.

* Es ist zu bemerken, daß diese Bezeichnung insofern irreführend ist, als mit dieser Bestimmung sowohl manche Steroide ohne 11-Hydroxygruppe erfaßt werden, z. B. Oestradiol, als auch manche mit einer 11-Hydroxygruppe nicht nachgewiesen werden können, z. B. Dexamethason (53).

Für den Cortisolstandard werden 50 mg Cortisol in 50 ml absolutem Äthylalkohol aufgelöst und weiter mit Aqua bidest. ad 100,0 ml aufgefüllt. Diese Lösung mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml ist auf Monate hinaus stabil, sofern sie bei einer Temperatur von $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt wird. Die weitere Verdünnung bis zu der gewünschten Konzentration geschieht mit Aqua bidest. Die benötigten Glaswaren wurden wie bei der Corticosteronbestimmung beschrieben gereinigt.

In einer Serie wurden jeweils ein Leerwert, ein Eichwert mit 1 Mikrogramm ($=\gamma$) Cortisol/ml und drei Plasmen, und zwar jeweils in Doppelbestimmung, gemessen. Dafür wurden in einem 20 ml fassenden, mit einem Glasstopfen verschließbaren Glaskolben 15 ml Methylenchlorid mit 2 ml der zu untersuchenden Flüssigkeit überschichtet. Für die Bestimmung des Leerwertes liefen die 15 ml Methylenchlorid ohne weiteren Zusatz bei den zu beschreibenden Reaktionsschritten mit. Die 10 Gläser wurden dann so in einen in Vertikalebene sich drehenden Rotor eingespannt, daß ihre Längsachsen in horizontaler Richtung zu liegen kamen. Die Rotorscheibe, die einen Durchmesser von etwa 25 cm hat, drehte sich 20 Minuten lang mit einer Frequenz von 33 Upm. Durch die relativ langsame Rotationsgeschwindigkeit wurde die Entstehung einer Emulsion vermieden.

Nach 20 Minuten wurde der Plasmaüberstand abgesaugt und das Methylenchlorid nach Einpipettieren von 2 ml 1 n NaOH 20 Sekunden lang von Hand heftig geschüttelt. 10 Minuten später, nachdem sich die beiden Schichten gut getrennt hatten, wurde die Natronlauge abgesaugt.

8 ml des noch vorhandenen Methylenchlorids wurden in einem frischen, 20 ml fassenden Glasröhrchen zu 4 ml Fluoreszenzreagenz gegeben und nach Verschuß des Glasgefäßes mit einem Glasstopfen 20 Sekunden lang von Hand heftig geschüttelt. Das überstehende Methylenchlorid wurde dann vollständig abgesaugt, das

Fluoreszenzreagenz in eine Spiegelglasküvette geschüttelt und exakt 13 Minuten nach dem Einpipettieren des Methylenchlorids in das Fluoreszenzreagenz im Fluoreszenzzusatzgerät zum Photometer Eppendorf mit derselben Filterkombination wie bei der beschriebenen Bestimmung des Corticosterons gemessen. Von den erhaltenen T-Werten (in % Durchlässigkeit = Transmission) wurde nun der T-Wert der Leerprobe abgezogen und der so gewonnene Wert anhand einer vorher aufgestellten Eichkurve für Cortisol in Mikrogramm Cortisol pro 2 ml bzw. in γ -% Cortisol umgerechnet.

Wir sind Herrn Dr. Kopera von der Firma ORGANON GmbH in Oss/Holland für die Gelegenheit zur Erlernung der Hypophys-ektomie, Herrn Dr. Vogel von der Firma FARBWERKE HOECHST AG, Frankfurt (M)-Hoechst und Herrn Dr. Voss von der Firma CIBA AG, Wehr/Baden für die Überlassung von ACTH-Ver-suchspräparaten zu Dank verpflichtet.

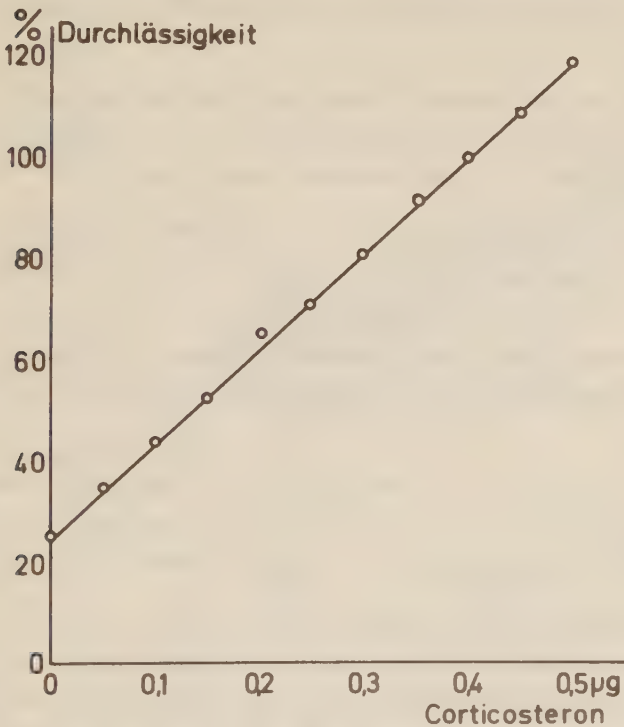
ERGEBNISSE

I. Corticosteronbestimmung

1) Corticosteron-Eichkurven

Wie unter "METHODEN" ausgeführt, erfolgte die Umrechnung der abgelesenen Fluoreszenzwerte in Corticosteronmengen an-

Abb. 12 Corticosteron-Eichkurve



Die Abbildung zeigt einen linearen Verlauf für 0 bis 0,5 Mikrogramm Corticosteron. Die Fluoreszenzintensität ist für die einzelnen Corticosteronmengen nicht mit den im Text angegebenen mittleren Durchlässigkeitswerten identisch, da andere Schaltstufen bzw. Eichstandards benutzt wurden.

hand einer aus zwei mit der jeweiligen Bestimmungsreihe mitlaufenden Eichwerten erstellten Eichkurve. Als Eichwerte dienten ein Wasserwert und eine 0,2 μg Corticosteron enthaltende Probe. Die Benutzung einer zusammen mit den zu bestimmenden Plasmacorticosteronwerten gewonnenen Eichkurve erwies sich aus mehreren Gründen als notwendig:

Erstens kommt es mit zunehmendem Alter des Fluoreszenzreagenz zu einer Erhöhung der Durchlässigkeitswerte. Das Ausmaß der Erhöhung ist unabhängig von der Größe des Ausgangswertes.

Zweitens ist, wie bereits erwähnt, die Fluoreszenzintensität von dem zwischen Beendigung der Extraktion und Ablesung am Photometer verstrichenen Zeitraum abhängig (Abb. 11).

Bei 78 Bestimmungen ergab sich für den Wasserwert eine mittlere Durchlässigkeit von 24,7 %, für 0,2 μg eine solche von 110,1 %. Die mittlere Differenz der beiden Eichproben betrug demnach 85,4 % mit einer Standardabweichung von 9,0 %. Die Höhe dieser Differenz war unabhängig von der Höhe des Wasserwertes.

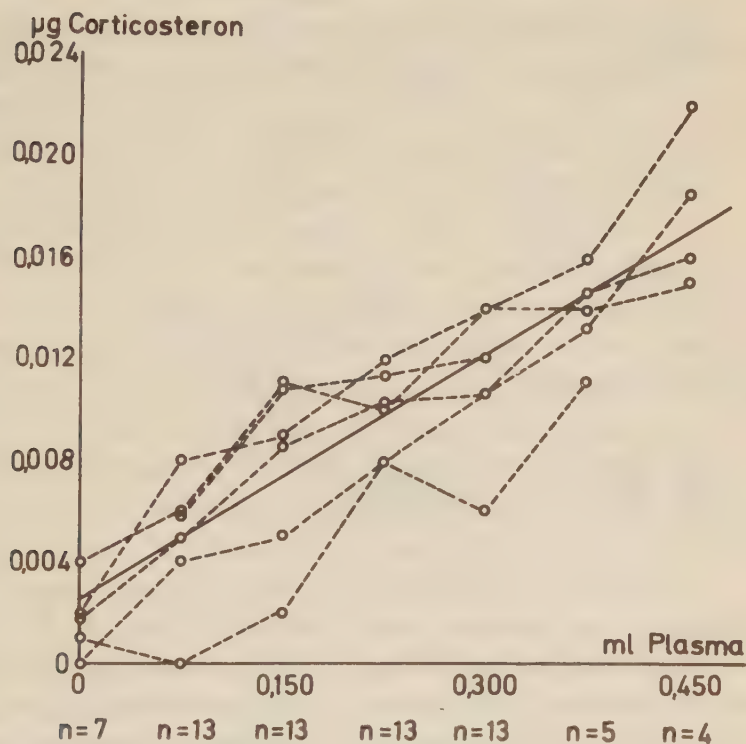
Die Linearität der Corticosteroneichkurven wurde in dem uns interessierenden Bereich von 0 bis 3,0 μg Corticosteron nachgeprüft (s. auch Abb. 12).

2) Basisfluoreszenz von Rattenplasma

Die Fluoreszenz von Plasma aus dem peripheren Blut hypophys-ektomierter Ratten wurde anhand von 68 Plasmaproben verschiedener Volumina von 0,075 - 0,450 ml (= 0,100 - 0,600 HkE) bestimmt. Es ergab sich ein annähernd linearer Anstieg der Fluoreszenz mit steigenden Volumina in dem von uns bestimmten Bereich, wobei eine Zunahme des Volumens um 0,075 ml eine Erhöhung der Durchlässigkeit in Prozent entsprechend 0,0024 μg Corticosteron zur Folge hatte (Abb. 13). Wir bezeichneten diese

Fluoreszenzintensität als Basisfluoreszenz des Rattenplasmas
(vgl. auch Kap. III).

Abb. 13 Fluoreszenzintensität von peripherem Plasma hypophysektomierter Ratten, ausgedrückt in Mikrogramm Corticosteron



Es zeigt sich ein annähernd linearer Anstieg der sog. "Basisfluoreszenz" des Rattenplasmas von 0 bis 0,450 ml. Der mittlere Anstieg entspricht für 0,075 ml (= 0,100 HkE) Plasma der Fluoreszenzintensität von 0,0024 Mikrogramm Corticosteron.

3) Ausbeute bei Corticosteronzusatz zu Rattenplasma

Abb. 14 a, b Ausbeute bei Corticosteronzusatz zu Rattenplasma (vgl. auch Legende Abb. 12)

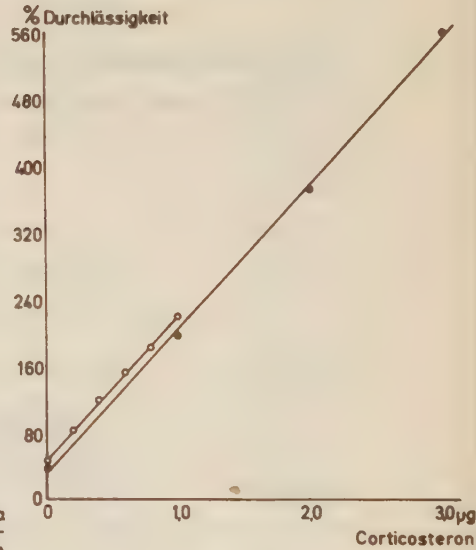
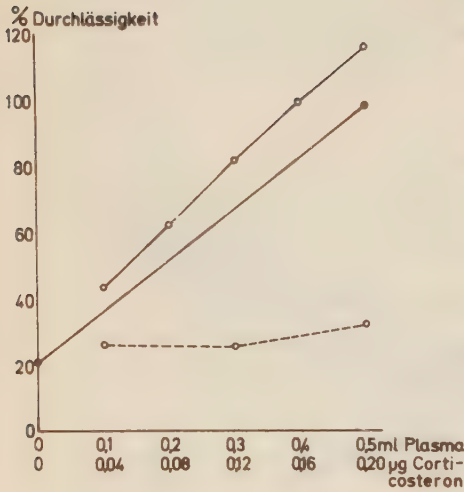


Abb. 14 a

Fluoreszenzintensität verschiedener Mengen Rattenplasma mit gleicher Konzentration (0,4 Mikrogramm/ml) an zugegebenem Corticosteron im Vergleich zu einer Corticosteroneichkurve und der "Basisfluoreszenz" des Rattenplasmas.

●—● Corticosteron ○—○ Rattenplasma mit 0,4 Mikrogramm Corticosteron pro ml ○—○ Basisfluoreszenz des Rattenplasmas

Abb. 14 b

Fluoreszenzintensität konstanter Mengen Rattenplasma (0,2 ml) mit verschiedenen Mengen Corticosteron im Vergleich mit einer Corticosteroneichkurve ohne Plasma.

●—● Corticosteron
○—○ Corticosteron + 0,2 ml Plasma

Nach Zugabe von Corticosteron zu Rattenplasma kann bei einer folgenden quantitativen Bestimmung des Corticosterons nach ZENKER und BERNSTEIN (24) mit einer 100%igen Ausbeute gerechnet werden (Abb. 14a, 14b). Dies spricht unter anderem für eine weitgehende Stabilität des Corticosterons im Plasma in vitro.

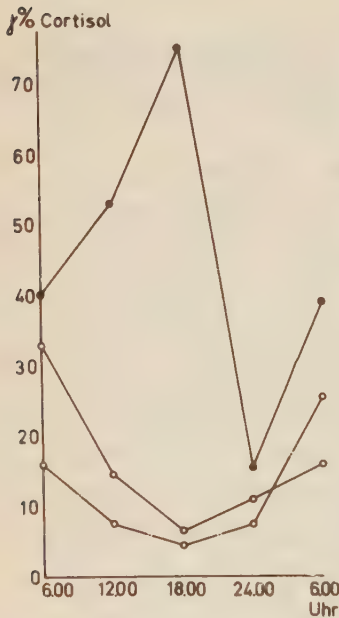
II. Sogenannte "11-Hydroxy-Corticosteroide" im menschlichen Plasma

1) Tagesschwankungen der sog. "11-Hydroxy-Corticosteroide" im menschlichen Plasma

Wir haben die bereits seit langem bekannten Veränderungen des Cortisolspiegels beim Menschen während 24 Stunden mittels der fluorimetrischen Bestimmung der "11-Hydroxy-Corticoide" (s. METHODEN) bei zwei Normalpatienten und einer Patientin mit einem Cushing-Syndrom untersucht. Es zeigte sich, in Übereinstimmung mit den bei einer weiteren, größeren Untersuchungsserie (54), wie auch mit den mittels anderer Bestimmungsmethoden gewonnenen Tagesprofilen, bei Normalpersonen ein maximaler Plasmaspiegel um 6 Uhr morgens, verglichen mit den um 12 Uhr, 18 Uhr und 24 Uhr abgenommenen Blutproben. Die enge Korrelation des ACTH- und Cortisolspiegels ließ vermuten, daß zu diesem Zeitpunkt auch der ACTH-Spiegel ein Maximum erreicht haben müßte (55, 56). Wir haben aus diesem Grund die Entnahme der Blutproben für die ACTH-Bestimmung jeweils um 6 Uhr morgens vorgenommen (s. METHODEN). Das Verhalten des "11-OH-Corticosteroid"-Plasmaspiegels bei Patienten mit einem Cushing-Syndrom ließ erwartungsgemäß die normale Tagesrhythmik vermissen (57) (Abb. 15a. Tab. 1).

Abb. 15 a

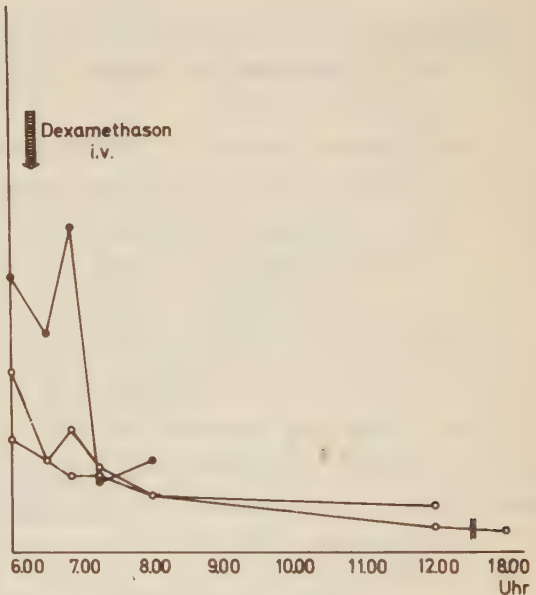
Tagesschwankungen der sog.
"11-Hydroxy-Corticosteroide"
im menschlichen Plasma.



"11-OH-CS"-Plasmaspiegel
von 2 Normalpersonen (L.H.,
J.A.) und einer Patientin mit
Cushing-Syndrom (E.T.) um
6.00, 12.00, 18.00 und
24.00 Uhr. Störung des nor-
malen Tagesrhythmus (54) bei
der Patientin mit Cushing-
Syndrom.

Abb. 15 b

Verhalten des "11-Hydroxy-Corticoste-
roid"-Plasmaspiegels nach rascher
intravenöser Infusion von Dexamethason.



Deutliche Suppression des "11-OH-CS"-
Plasmaspiegels nach i.v.-Infusion von
4 mg Dexamethason morgens um 6.00
Uhr bei 2 Normalpatienten und einer Pa-
tientin mit Cushing-Syndrom.

(Versuche mit M. MÜLLER-BARDORFF

(54, 58) ○—○ Normalpersonen

●—● Cushing-Syndrom

Tab. 1 Tagesschwankungen der "11-OH-Corticoide" im Plasma von zwei Normalpersonen und einer Patientin mit Cushing-Syndrom (Erläuterung s. Text)

Patient	"11-OH-Corticoid"-Spiegel (γ-%) um				
	6.00 Uhr	12.00 Uhr	18.00 Uhr	24.00 Uhr	6.00 Uhr
L.H., 25 J. männlich Normalpatient	33,0	14,5	6,5	11,0	16,0
J.A., 16 J. männlich Normalpatient	16,0	7,5	4,5	7,5	12,5
E.T., 44 J. weiblich Cushing-Syndrom	40,0	53,0	75,0	15,5	39,0

2) Verhalten des "11-Hydroxy-Corticoid"-Plasmaspiegels nach rascher intravenöser Infusion von Dexamethason

Dexamethason (9 α -fluoro-16 α -methyl- Δ^1 -Cortisol) ist in seiner Glucocorticoidwirkung etwa 30 - 50 mal so stark wie Cortisol. Es besitzt einen ausgeprägten supprimierenden Effekt auf die Ausschüttung des ACTH und vermindert damit die Cortisolinkretion der Nebennierenrinde (58-62). Man darf annehmen, daß mit 4 mg Dexamethason bei Normalpersonen eine maximale Suppression der ACTH-Inkretion zu erreichen ist, mit Sicherheit allerdings nur bei einer längeren Applikationsdauer, etwa einer Tropfinfusion über mehrere Stunden (25). Wir haben die 4 mg Dexamethason innerhalb von 4 - 8 Minuten in Form einer raschen intravenösen Infusion zugeführt (s. METHODEN) und erreichten damit, wie später noch gezeigt werden wird, nicht in jedem Falle eine maximale Suppression, konnten uns jedoch einen Eindruck von der mehr oder weniger empfindlichen akuten Ansprechbarkeit des Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems auf exogene Steroide verschaffen.

Das Verhalten des "11-OH-CS"-Spiegels nach Dexamethason bei zwei Normalpersonen und einer Patientin mit Cushing-Syndrom ist in Tab. 2 und Abb. 15 b dargestellt. Es zeigte sich, daß in allen Fällen eine Stunde nach der intravenösen Applikation von Dexamethason ein deutliches Absinken des "11-OH-CS"-Plasmaspiegels festzustellen war, zu einem Zeitpunkt also (7.00 Uhr), da der Abfall im Rahmen der normalen Tagesschwankung noch unerheblich ist. Allerdings lagen diese "11-OH-CS"-Spiegel noch deutlich über den Werten, die sich beispielsweise nach dreitägiger Behandlung mit 30 mg Prednisolon pro die als Ausdruck der maximalen Suppression der Cortisolinkretion der Nebennierenrinde nachweisen lassen. Da die ACTH-Ausschüttung noch vor der Corticoidsekretion gebremst werden muß, kann man eine Stunde nach der intravenösen Applikation von Dexamethason mit einer sicheren Suppression der ACTH-Sekretion rechnen.

Tab. 2 Verhalten des "11-OH-CS"-Plasmaspiegels nach rascher intravenöser Infusion von Dexamethason (Erläuterung s. Text)

Zeitpunkt der Blutentnahme (Minuten nach Infusionsbeginn)	"11-OH-CS"-Plasmaspiegel		(γ %) bei
	L. H. Normalpersonen	J. A.	E. T. Cushing-Syndrom
- 5	16,0	26,0	39,0
0 - 8	i. v. -Infusion von 4 mg Dexamethason		
+ 15	13,0	13,0	31,0
+ 30	17,5	11,0	46,0
+ 60	12,0	11,0	10,0
+105	8,0	8,0	13,0
+340	6,5	3,5	
+700		3,0	

Bei allen übrigen Patienten haben wir uns mit der Bestimmung von zwei "11-OH-CS"-Plasmaspiegeln begnügt, einem unmittelbar vor Dexamethasongabe und einem 60 Minuten nach Dexamethasonapplikation. Die Resultate sind in Tab. 3, nach Krankheitsgruppen geordnet, zusammengestellt.

Tab. 3 "11-OH-CS"-Spiegel vor und nach Dexamethason-Infusion (Zeitpunkt der Blutentnahme, Dexamethasoninfusion, Methodik s. Text)

Patienten	"11-OH-CS" (γ %) vor Dexamethason	"11-OH-CS" (γ %) 60 min. nach Dexamethason
Normalpatienten:		
L.H., 25J., männlich	16,0	12,0
J.A., 16J., männlich	26,0	11,0
K.J., 49J., männlich	36,5	23,0
W.M., 52J., männlich	30,0	21,0
B.J., 40J., männlich	23,0	18,0
H.P., 19J., männlich	16,0	8,0
K.M., 36J., männlich	14,5	9,0
B.O., 47J., männlich	32,0	25,0
E.M., 20J., männlich	24,0	15,0
Cushing-Syndrom:		
E.T., 44J., weiblich	39,0	10,0
	38,0*	30,0*
Morbus Addison:		
B.S., 48J., männlich	4,0	8,0
G.J., 18J., männlich	7,0	7,0
Totaladrenalektomierte Patienten:		
E.L., 19J., männlich	5,0	8,0
M.E., 44J., weiblich	10,0**	17,0**
Adrenogenitales Syndrom:		
W.L., 21J., weiblich	22,0	14,0

* Diese Werte wurden etwa 4 Monate nach einseitiger Adrenalektomie gewonnen.

**Die Corticoidsubstitution wurde bei dieser Patientin im Gegensatz zu dem sonst üblichen Verfahren (s. Text) aus Versehen bis zum Vorabend des Untersuchungstages weitergeführt.

Die Corticoidsubstitution der Patienten mit M. Addison und nach Totaladrenalektomie wurde am Morgen des Tages vor der Blutentnahme zur ACTH- und "11-OH-CS"-Bestimmung abgebro-

chen, so daß diese Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme etwa 24 Stunden lang keine exogenen Corticosteroide erhielten.

Die "11-OH-CS"-Werte der sieben von uns untersuchten Normalpatienten lagen vor der Dexamethasoninfusion mit $25,1 \gamma \%$ im Mittel etwas über dem Normalbereich von $5,0 - 22,0 \gamma \%$ (54), was als Folge der bereits früher erwähnten Tagesrhythmik des Plasmacorticoidspiegels anzusehen ist, da die zur Festlegung des Normalbereiches verwandten Plasmen um 9 Uhr gewonnen wurden, während im Rahmen unserer Versuche das Blut bereits um 6 Uhr, d.h. zur Zeit eines höheren Plasmacortisolspiegels, abgenommen wurde.

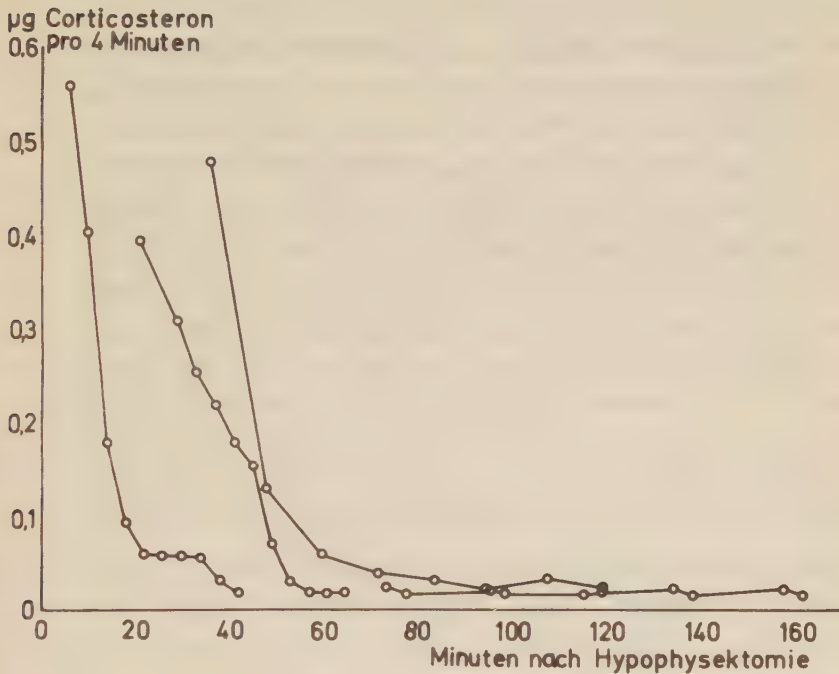
Die Suppression des "11-OH-CS"-Spiegels 60 Minuten nach Dexamethason auf einen Mittelwert von $17,0 \gamma \%$ ist sicherlich zu einem Teil ebenfalls auf den physiologischen Abfall desselben zwischen 6.00 und 7.00 Uhr zurückzuführen.

III. Corticosteroninkretion in das Nebennierenvenenblut der Ratte nach

Hypophysektomie

Wie Abb. 16 zeigt, sinkt die Corticosteroninkretion in das Nebennierenvenenblut bei Ratten nach der Hypophysektomie zunächst rasch in einer angenähert linearen Funktion ab und erreicht etwa 45 - 80 Minuten nach beendeter Hypophysektomie Basiswerte (25,43). Wieweit für die Dauer des Abfalls die Schwere der Traumatisierung bei der Operation, die Kreislaufverhältnisse oder andere Faktoren eine Rolle spielen, sollte in diesem Zusammenhang nicht geklärt werden. Es darf jedoch als sicher gelten, daß 90 Minuten nach vollzogener Hypophysektomie im Nebennierenvenenblut lediglich noch eine Basisfluoreszenz festzustellen ist. Zahlreiche Corticosteronbestimmungen im Nebennierenvenenblut, das bis zu 5 Stunden nach beendeter Hypophysektomie abgenommen worden war, ergaben kein weiteres Absinken der Fluoreszenzintensität.

Abb. 16 Corticosteronsekretion in das Nebennierenvenenblut der Ratte nach Hypophysektomie



Rascher Abfall der Corticosteronmengen in den jeweils 4 Minuten lang gesammelten Blutproben aus der Nebennierenvene mit Zunahme des nach der Hypophysektomie verstrichenen Zeitraumes. Basissekretion wird spätestens 80 Minuten nach beendeter Hypophysektomie erreicht.

Der Mittelwert der Corticosteronmengen bzw. der auf einer Corticosteroneichkurve umgerechneten Fluoreszenz in 133 zwischen der 90. und 120. Minute nach beendeter Hypophysektomie jeweils innerhalb von 4 Minuten gesammelten Nebennierenvenenplasma entsprach $0,0170 \mu\text{g}$ Corticosteron mit einer Standardabweichung von

0,0010 μg . Das ergibt bei einer mittleren Plasmamenge von 0,1125 ml pro 4 Minuten auf das Plasmavolumen bezogen eine Basisfluoreszenz entsprechend 0,0170 μg Corticosteron pro 0,1125 ml Nebennierenvenenplasma gegenüber 0,0066 μg Corticosteron pro 0,1125 ml peripheren Plasmas (vgl. unter 1,2). Das würde bedeuten, daß 90 - 120 Minuten nach Hypophysektomie im Nebennierenvenenblut der Ratte eine corticosteronbedingte Fluoreszenz von mindestens 0,0104 μg Corticosteron pro 0,1125 ml Plasma vorhanden ist, was einem Corticosteronspiegel von 9,24 $\mu\text{g}\%$ entspricht. Dieser Wert ist jedoch nur größenordnungsmäßig zu betrachten, da, wie später (Kap. IV, 2) noch ausgeführt werden wird, die aus dem Nebennierenvenenblut bestimmten Corticosteronwerte pro Zeiteinheit nicht ohne weiteres in Corticosteronmengen pro Plasmavolumen umgerechnet werden können. Aus der Tatsache, daß offenbar auch bei hypophysektomierten Ratten - zumindest in dem von uns untersuchten Zeitraum von wenigen Stunden nach der Hypophysektomie - Corticosteron über die Nebennierenvene in das periphere Blut gelangt, darf geschlossen werden, daß auch im peripheren Plasma ein nicht näher bekannter Prozentsatz der sog. Basisfluoreszenz durch Corticosteron bedingt ist. Es ist bekannt, daß die Ansprechbarkeit der Nebennierenrinde auf ACTH, soweit es die Corticosteronsynthese betrifft, mit der Länge der nach der Hypophysektomie verstrichenen Zeit abnimmt (25, 37, 47, 63). Wir haben mit der ersten Sammelperiode für die ACTH-Bestimmung (s. METHODEN) 90 Minuten nach beendeter Hypophysektomie begonnen, da zu diesem Zeitpunkt einerseits der Corticosteronspiegel im Nebennierenblut sicher auf Basiswerte abgesunken ist, andererseits der relativ kurze, seit der Hypophysektomie verstrichene Zeitraum eine optimale Sensibilität der Nebennierenrinde gegenüber ACTH gewährleisten sollte.

IV. ACTH-Wirkung auf die Corticosteronsekretion

1) Verhalten der Corticosteronmengen im Nebennierenvenenblut nach einmaliger intraarterieller Applikation von ACTH

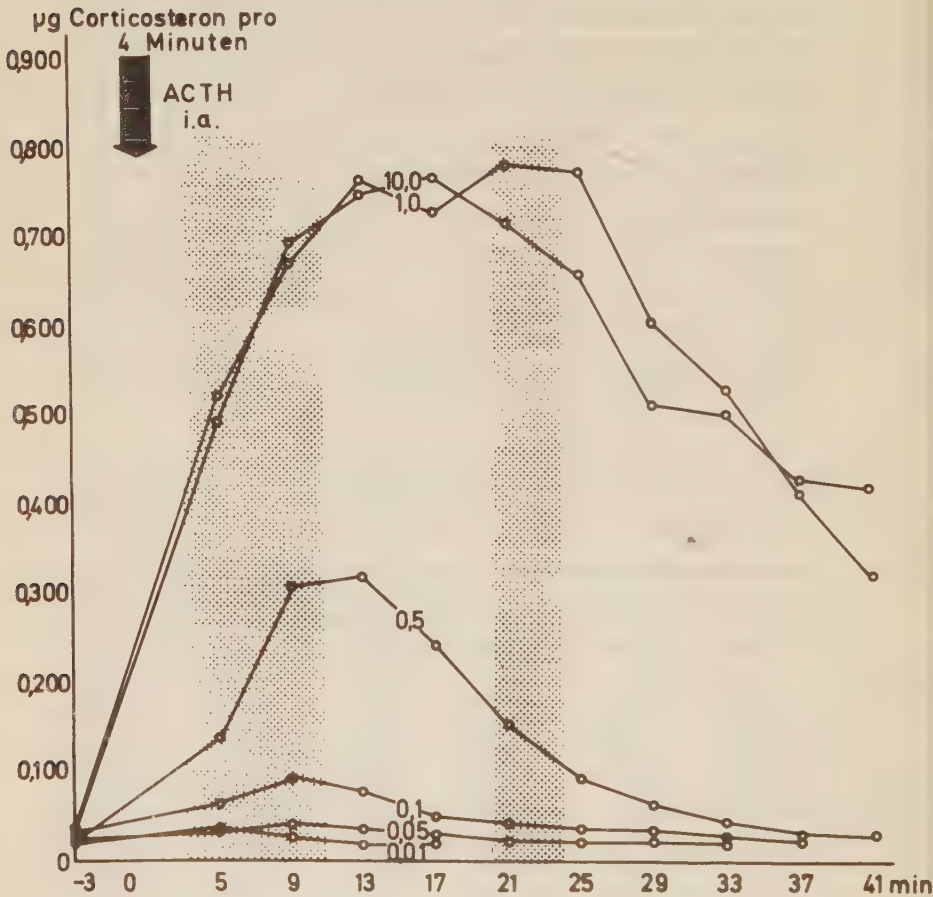
Zur Festlegung des optimalen Zeitraumes der Blutentnahme aus der Nebennierenvene nach ACTH-Applikation und der Dauer der Steigerung der Corticosteronsekretion auf verschiedenen große ACTH-Dosen wurde die Veränderung der Corticosteronsekretion über einen Zeitraum von der 5. Minute vor bis zur 46. Minute nach Beginn einer 60 Sekunden oder 94 Sekunden dauernden intraarteriellen ACTH-Infusion (s. METHODEN) untersucht. Es wurde zu diesem Zweck in dem genannten Zeitraum aus dem Nebennierenvenenkatheter fortlaufend Blut in einzelnen 4-Minuten-Fractionen gesammelt und deren Corticosterongehalt in der üblichen Weise bestimmt. Die Ergebnisse sind aus Tab. 4 und Abb. 17 ersichtlich.

Tab. 4 Mittelwerte der fortlaufend gesammelten Corticosteronmenge pro 4 Minuten im Nebennierenvenenblut nach ACTH (vgl. Abb. 17)

Zeit	Corticosteronmenge (μg) pro 4 min. nach folgenden ACTH-Dosen 0,01 (mE) 0,05 (mE) 0,10 (mE) 0,50 (mE) 1,00 (mE) 10,00(mE)					
- 5 - -1	0,014	0,023	0,029	0,019	0,027	0,026
- 1 - +3	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
+ 3 - +7	0,035	0,030	0,060	0,134	0,510	0,492
+ 7 - 11	0,023	0,038	0,088	0,305	0,668	0,692
11 - 15	0,015	0,032	0,071	0,315	0,761	0,746
15 - 19	0,018	0,026	0,045	0,238	0,725	0,764
19 - 23	0,018	0,018	0,038	0,148	0,779	0,711
23 - 27		0,017	0,032	0,088	0,769	0,652
27 - 31		0,018	0,031	0,059	0,599	0,505
31 - 35		0,016	0,025	0,042	0,523	0,495
35 - 39			0,019	0,029	0,405	0,422
39 - 43				0,027	0,314	0,413
n =	2	3	4	1	3	3

Es zeigte sich zunächst, daß sowohl die Höhe, als auch die Dauer des Corticosteronanstieges (25) im Nebennierenvenenblut mit steigenden ACTH-Dosen bis zu einem Grenzwert zunahm. Dabei lag der Zeitpunkt der maximalen Corticosteron-

Abb. 17 Zeitlicher Ablauf der Corticosteronsekretion in das Nebennierenvenenblut nach einmaliger intraarterieller Applikation verschiedener Mengen ACTH



Zunahme der Corticosteronsekretion in das Nebennierenvenenblut mit steigenden ACTH-Dosen bis zu einem Grenzwert. Verlängerung der Dauer des Anstieges der Corticosteroninkretion und Anwachsen des zeitlichen Intervalls zwischen Applikation des ACTH und Maximum der Corticosteroninkretion ebenfalls mit steigenden ACTH-Dosen. Die ACTH-Dosen sind in Milli-Einheiten in der Abbildung vermerkt.  Sammelperiode bei ACTH-Bestimmung.

pro-4 Minuten-Menge - bezogen auf den Zeitpunkt der ACTH-Applikation - umso später, je größer die applizierte ACTH-Dosis war. In dem uns hauptsächlich interessierenden Bereich zwischen 0,01 und 0,10 mE lagen die Maxima der Corticosteronausschüttung zwischen der 3. und der 11. Minute nach Beginn der ACTH-Infusion. Wir entschlossen uns deshalb, diesen Zeitraum zur Bestimmung des Corticosteronanstieges nach ACTH zu wählen.

Das Integral der in Abb. 17 gezeigten Verlaufskurven, d.i. den gesamten Corticosteronanstieg nach einer einmaligen ACTH-Gabe, haben wir durch einfache Addition der einzelnen Corticosteron-pro-4-Minuten-Mittelwerte einer jeden Verlaufskurve abzüglich des Corticosteron-pro-4-Minuten-Ausgangswertes vor ACTH ermittelt. Es ergaben sich unter ausschließlicher Berücksichtigung der positiven Werte und nach Extrapolation von drei Corticosteron-pro-4-Minuten-Mengen aus dem Kurvenverlauf für die 43. - 55. Minute der Verlaufskurve für 1 mE ACTH folgende Werte:

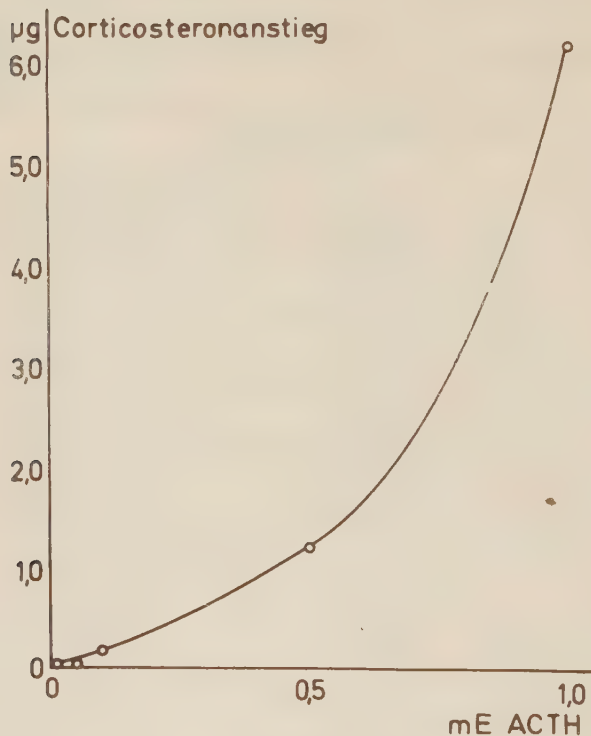
Tab. 5 Gesamter Corticosteronanstieg auf verschiedene ACTH-Dosen

ACTH - Dosen (mE)	0,01	0,05	0,10	0,50	1,00
Corticosteronanstieg (μ g)	0,031	0,034	0,162	1,195	6,104

Die graphische Darstellung (Abb. 18) macht für den Bereich von 0,01 - 1,00 mE ACTH folgende Funktion wahrscheinlich:

$$\text{Dosis ACTH} = {}^a\log \int_0^t \text{Corticosteronanstieg-pro 4 Minuten,}$$
wobei a = Basis des Logarithmus, 0 = Zeitpunkt des Beginns der ACTH-Applikation, $t \rightarrow \infty$ = beliebiger Zeitpunkt nach Wiedereintritt der Basissekretion.

Abb. 18 Gesamte Zunahme der in die Nebennierenvene abgegebenen Corticosteronmenge gegenüber der Basissekretion nach einmaliger intraarterieller Applikation verschiedener Mengen ACTH.



Die ACTH-Dosis ist in dem dargestellten Bereich von 0 bis 1,0 mE zum Logarithmus des gesamten Corticosteronanstieges in der Zeit von 0 bis unendlich nach der ACTH-Applikation direkt proportional.

Bei 10,0 mE ACTH bleibt der Gesamtcorticosteronanstieg gegenüber dem von 1,0 mE ACTH praktisch gleich. Es scheint also bereits nach 1,0 mE ACTH bei dieser Art der ACTH-Applikation eine maximale Steigerung der Corticosteroninkretion der Nebennierenrinde vorzuliegen.

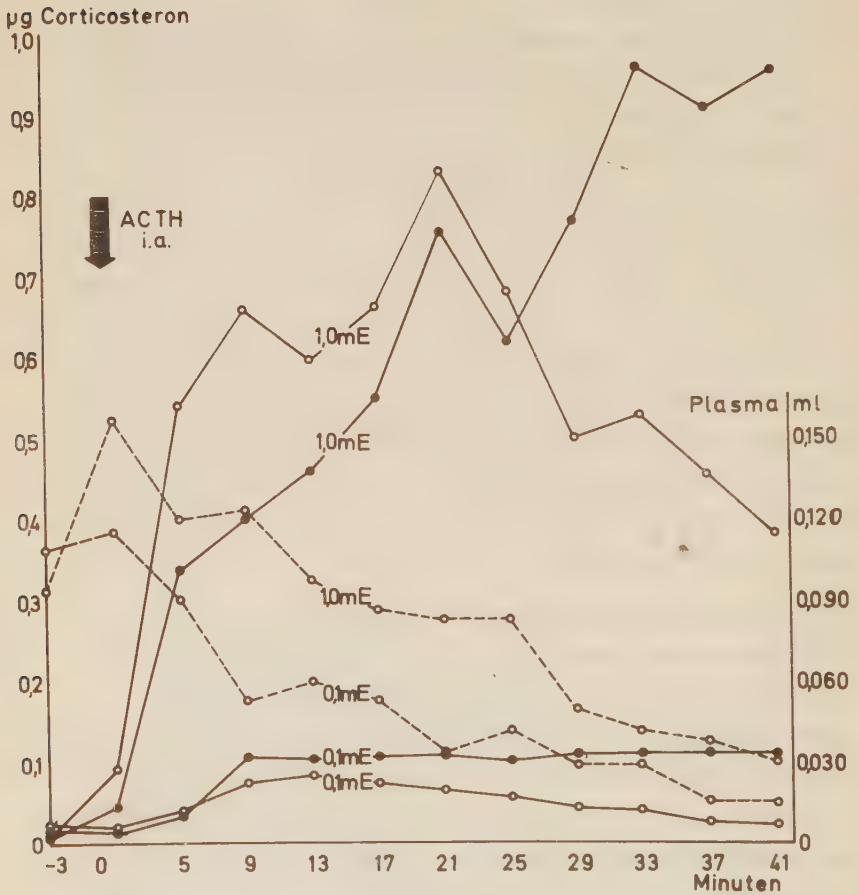
2) Vergleich der Corticosteronmengen pro Zeiteinheit mit der Corticosteronkonzentration im Nebennierenvenenplasma nach ACTH-Gaben

Aus den Corticosteron-pro-4-Minuten-Werten von zwei Verlaufskurven und den dazugehörigen Plasmamengen wurden die entsprechenden Corticosteronkonzentrationen pro 0,075 ml berechnet. Da die pro Zeiteinheit durch die Nebennierenvene fließende Blutmenge mit zunehmendem Blutverlust stetig abnimmt, sofern nicht eine Flüssigkeitssubstitution erfolgt, werden die Corticosteronkonzentrationen mit der Dauer des Sammelzeitraumes - verglichen mit den zugehörigen Corticosteron-pro-4-Minuten-Werten - relativ immer größer. Wie in Abb. 19 gezeigt ist, blieben beispielsweise die Corticosteronmengen pro 0,075 ml Plasma von der 7. Minute nach Beginn der ACTH-Applikation bis zur Beendigung des Versuches in der 45. Minute nach ACTH-Gabe nahezu konstant und ließen den für eine Dosis von 0,1 mE ACTH typischen Abfall der Corticosteronmengen pro 4 Minuten vermissen.

Wie wir bei zahlreichen anderen Verlaufskurven sahen, unterscheiden sich die Corticosteronmengen pro 4 Minuten bei ausreichender Substitution mit physiologischer Kochsalzlösung oder ähnlichem, d.h. bei annähernd konstanten Plasmavolumina nicht von den ohne Flüssigkeitersatz gewonnenen. Es darf deshalb angenommen werden, daß die Höhe der Corticosteronausschüttung in das Nebennierenvenenblut nach erfolgter Applikation kleiner ACTH-Dosen von der Menge des aus der Nebenniere abfließenden Blutes weitgehend unabhängig ist.

Da außerdem die gesammelten Plasmamengen in unterschiedlichem Ausmaß von nicht aus der Nebenniere gespeisten Zuflüssen, z.B. der Vena phrenica inferior, stammen, erscheint

Abb. 19 Vergleich der pro Zeiteinheit sezernierten Corticosteronmengen mit der Corticosteronkonzentration im Plasma aus der Nebennierenvene hypophysektomierter Ratten nach einmaliger Gabe von ACTH



Dargestellt ist der relative Anstieg der Corticosteronmengen pro 0,075 ml Plasma bei fallenden Plasmamengen gegenüber den in jeweils 4 Minuten sezernierten Corticosteronmengen nach intraarterieller Applikation von 0,1 bzw. 1,0 mE ACTH. ○—○ ml Plasma ○—○ Corticosteron pro 4 Minuten ●—● Corticosteron pro 0,075 ml Plasma

die Corticosteronmenge pro Zeiteinheit als die einzig relevante Bezugsgröße zur Bestimmung der ACTH-Wirksamkeit.

V. ACTH - Eichkurven

Die Beziehung zwischen bekannten ACTH-Dosen und deren Wirkung auf die Corticosteronsekretion ließ sich nicht einfach aus dem fluorimetrisch bestimmten Corticosterongehalt im Nebennierenvenenblut aufstellen, es mußten vielmehr rechnerische Korrekturen durchgeführt werden, da einerseits das periphere Plasma der hypophysektomierten Ratte eine gewisse Basisfluoreszenz aufweist (vgl. Kap. I, 2) und andererseits die aus der Nebennierenvene gewonnene Blutmenge - bezogen auf die Zeiteinheit - vor und nach ACTH-Gabe nicht gleich groß war. Dabei spielen sowohl eine Steigerung der Durchblutung der Nebenniere als spezifischer Effekt des ACTH (64, 65), als auch eine akute Erhöhung des Blutvolumens durch die intraarterielle Infusion von 1 ml Flüssigkeit eine Rolle. Will man die als spezifisch anzusehende Steigerung der Corticosteronsekretion durch ACTH in der Zeiteinheit erfassen, so müssen die gemessenen Corticosteronmengen gegen die unspezifische Fluoreszenz des Plasmas korrigiert werden.

Als Kriterium für den Effekt der ACTH-Applikation verwandten wir den Anstieg der Corticosteronmenge im Nebennierenvenenblut von der 3. - 11. Minute nach Beginn der ACTH-Gabe gegenüber der Corticosteronmenge während einer 4-Minuten-Sammelperiode unmittelbar vor der ACTH-Applikation. Um diese beiden Werte vergleichen zu können, wurde zunächst von der gemessenen Fluoreszenzintensität jeder Probe, ausgedrückt in Mikrogramm Corticosteron, die Basisfluoreszenz des zugehörigen Volumens Plasma abgezogen, die - wie unter ERGEBNISSEN (Kap. I, 2) gezeigt - für peripheres Plasma hypophysektomierter Ratten 0,0024 μ g Corticosteron pro 0,075 ml entspricht. Der derartig korrigierte 4-Minuten-Wert

wurde nun verdoppelt und von dem ebenfalls gegen das Plasma korrigierten 8-Minuten-Wert subtrahiert. Wir bezeichnen den auf diese Weise erhaltenen Wert als Corticosteronanstieg.

Die Berechtigung des geschilderten Verfahrens ergibt sich aus der bereits früher besprochenen Annahme, daß die Höhe der Corticosteroninkretion in das Nebennierenvenenblut lediglich eine Funktion der Zeit - und natürlich des ACTH-Spiegels - nicht aber primär des Blutvolumens in der Nebennierenvene, also der Corticosteronkonzentration (37) ist. Man darf deshalb ohne weiteres die corticosteronbedingte Fluoreszenz im Nebennierenvenenblut einer hypophysektomierten, nicht durch exogenes ACTH stimulierten Ratte während einer Sammelperiode von 4 Minuten einfach verdoppeln, um die entsprechende, in einer 8-Minuten-Sammelperiode unter gleichen Umständen zu erwartende Corticosteronmenge zu errechnen. Wir haben versuchsweise außerdem mehrmals die Plasmamenge der 8-Minuten-Sammelperiode nach ACTH in zwei gleiche Volumina aufgeteilt und mit jeder Hälfte in der üblichen Weise die Fluoreszenzintensität bestimmt. Diese Verfahrensweise hat den Vorteil, daß die Plasmavolumina der 4-Minuten-Sammelperiode vor ACTH etwa der Hälfte der Plasmavolumina der 8-Minuten-Sammelperiode nach ACTH entspricht, so daß sich eine Korrektur der ermittelten Fluoreszenzwerte gegen die Plasmamenge weitgehend erübrigt. Außerdem haben vereinzelte Fehler bei der Corticosteronbestimmung, wie falsches Pipettieren oder ähnliches infolge Vorhandenseins eines zweiten identischen Wertes nicht die Unbrauchbarkeit des gesamten Versuches zur Folge. Bei Vergleich dieser Verfahrensweise mit der oben beschriebenen Methode zeigten sich gut übereinstimmende Ergebnisse. Der nicht unerheblich größere Arbeitsaufwand bei der Corticosteronbestimmung ließ uns jedoch von der Teilung der 8-Minuten-Plasmamengen wieder abgehen.

Prinzipiell ist natürlich die Ausdehnung der Sammelperiode vor der ACTH-Injektion von 4 auf 8 Minuten möglich. Wir hatten die 4-Minuten-Sammelperioden unter der Vorstellung eingeführt, daß wir bei jeder Ratte vier ACTH- bzw. Plasmainjektionen durchführen könnten, was einer Versuchsdauer von etwa 90 Minuten entsprochen hätte. Unter diesen Umständen hätte eine Verlängerung der 4-Minuten-Sammelperioden auf 8 Minuten zu einem unerwünscht starken Blutverlust der Ratten geführt. Bei nur zweimaliger ACTH- bzw. Plasmaapplikation kann dagegen unbedenklich auch vor der ACTH-Infusion 8 Minuten lang Blut gesammelt werden, was die oben beschriebene Verdoppelung der durch Corticosteron bedingten Fluoreszenz des 4-Minuten-Wertes überflüssig macht.

In der oben beschriebenen Weise wurde zunächst der Mittelwert für den Corticosteronanstieg nach Applikation von 0,9%-iger Kochsalzlösung bzw. 0,001 n HCl - 0,9 % NaCl-Lösung aus 11 Bestimmungen zu $-0,0056 \mu\text{g}$ Corticosteron mit einer Standardabweichung von $\sigma_{\bar{x}} = 0,012$ ermittelt. Der Normalbereich betrug also unter Berücksichtigung der 2σ -Grenze $-0,006 \pm 0,024 \mu\text{g}$ Corticosteron. Nach Eliminierung eines außerhalb dieses Normalbereiches liegenden Wertes ergab sich ein endgültiger Mittelwert für den Corticosteronanstieg nach Applikation von physiologischer Kochsalzlösung von $-0,003 \pm 0,019 \mu\text{g}$ Corticosteron. Die Standardabweichung des Mittelwertes $\sigma_{\bar{x}}$ war 0,0038.

Der hier angegebene Mittelwert, wie auch alle folgenden, wurde durch einfache Addition der Einzelwerte und anschließender Division durch die Anzahl der Einzelwerte (=n) erhalten, also nach

$$M_{\bar{x}} = \frac{\sum x}{n}.$$

Die Standardabweichung errechnet sich aus der Formel

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2}{n^2}}$$

Die Standardabweichung des Mittelwertes berechnet sich nach

$$\sigma_{\bar{x}} = \frac{\sigma_x}{\sqrt{n - 1}}$$

Die Werte für den Corticosteronanstieg nach verschiedenen Dosen ACTH sind in Tab. 6 zusammengefaßt und in Abb. 20 graphisch dargestellt.

Tab. 6 Mittelwerte der Corticosteronanstiege nach verschiedenen ACTH-Dosen

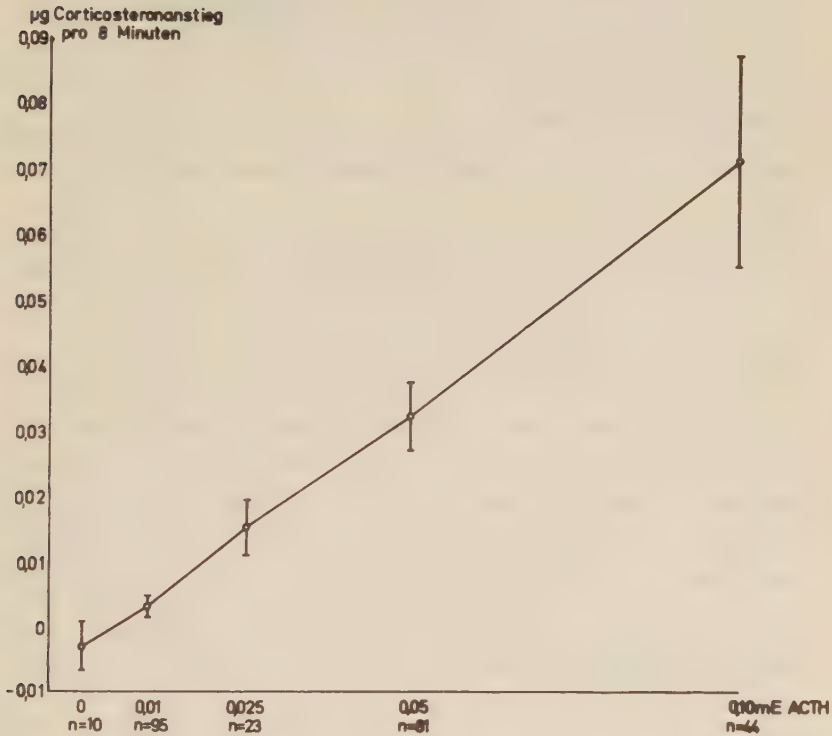
ACTH-Dosis (mE)	Corticosteron- anstieg (μ g)	Standard- abweichung	Standardab- weichung des Mittelwertes	Anzahl der Versuche
	M_x	σ_x	$\sigma_{\bar{x}}$	n
0,000	-0,003	0,0085	0,0038	10
0,010	+0,003	0,016	0,0016	95
0,025	+0,015	0,020	0,0043	23
0,050	+0,032	0,046	0,0051	81
0,100	+0,071	0,105	0,0160	44

Die graphische Darstellung der Beziehung zwischen ACTH-Dosen und den Mittelwerten des Corticosteronanstieges zeigt einen nahezu idealen linearen Verlauf. Im einzelnen wird diese Eichkurve durch folgende Koeffizienten charakterisiert:

Regressionskoeffizient $b_{xy} = \frac{\sum(xy - \bar{x}\bar{y})}{\sum(x - \bar{x})^2} = 0,75 \quad (66)$

Dieser Wert gibt an, um wieviel y (d.i. Corticosteronanstieg) im Durchschnitt wächst, wenn $\bar{x}$ (d.i. ACTH-Dosis) um eine Einheit größer wird ($\bar{x}$ und $\bar{y}$ bedeuten im folgenden die Mittelwerte von x und y).

Abb. 20 Eichkurve für ACTH (Synacthen^R) mit Angabe der Standardabweichungen der Mittelwerte $\sigma_{\bar{x}}$



Annähernd lineare Funktion zwischen ACTH-Dosis und Corticosteronanstieg für den Bereich von 0 bis 0,1 mE ACTH ($b = 0,75$, $r = 0,415$, $\lambda = 0,071$)

Korrelationskoeffizient

$$r = \frac{\sum(xy - \bar{x}\bar{y})}{\sqrt{[\sum(x - \bar{x})^2][\sum(y - \bar{y})^2]}} = 0,415 \quad (66)$$

Dieser Wert ist das geometrische Mittel der beiden Regressionskoeffizienten b_{yx} und b_{xy} .

Das Bestimmtheitsmaß $B = r^2 = 0,172$

ist ein Maß für die Schärfe, mit der eine Gerade bestimmt ist. Es gibt das Verhältnis der Streuung der Punkte der Regressionsgeraden zur Gesamtstreuung wieder. Ein Bestimmtheitsmaß von 0,172 besagt beispielsweise, daß sich 17,2 % der Streuung der y-Werte aus der Veränderung der x-Werte durch lineare Regression erklären lassen.

Der "Index of precision" oder Genauigkeitsindex berechnet sich nach

$$\lambda = S_b/b = 0,071, \text{ wobei } S_b = \sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n-2} (1-r^2)} = 0,0535 \text{ (44,67)}$$

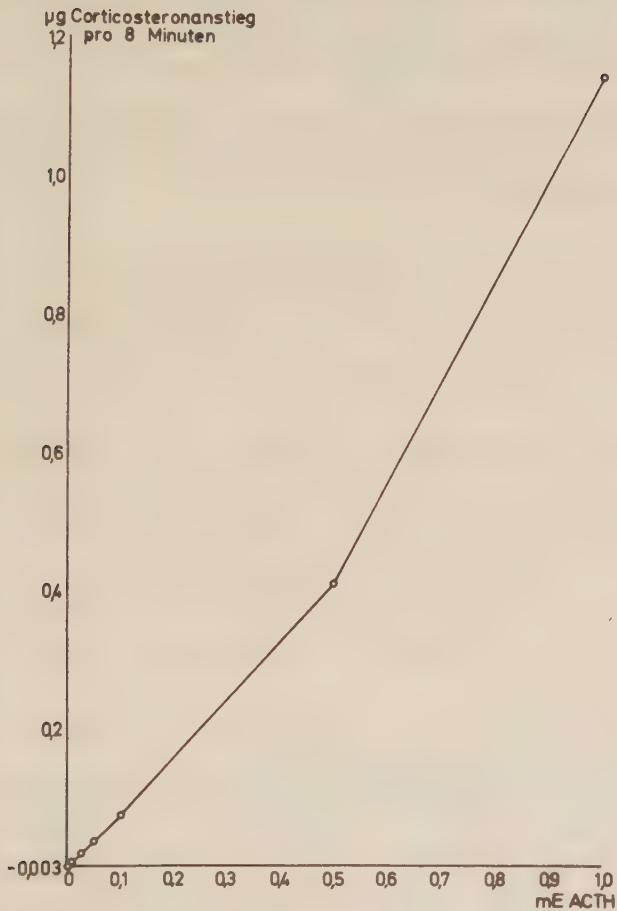
Die notwendige Weiterführung der Eichkurve über 0,10 mE ACTH hinaus erfolgte durch Einbeziehung der im Rahmen der Verlaufskurven gewonnenen Werte über den Corticosteronanstieg pro 8 Minuten nach 0,50 mE und 1,00 mE ACTH. Die Berechnung wurde in der oben beschriebenen Weise durchgeführt. Es ergab sich dabei für 0,50 mE ACTH ein Corticosteronanstieg pro 8 Minuten von 0,404 μg und für 1,00 mE ACTH ein solcher von 1,135 μg (Abb. 21). Eine statistische Auswertung dieser Daten ist wegen der geringen Anzahl der zur Verfügung stehenden Einzelwerte nicht sinnvoll.

In diesem Zusammenhang darf nochmals darauf hingewiesen werden, daß nach 1,0 mE ACTH ein praktisch maximaler Corticosteronanstieg erfolgt. Die Eichkurve würde für höhere ACTH-Dosen deshalb parallel zur Abszisse verlaufen.

Bei der Berechnung der Signifikanzschranken der Corticosteronanstiege pro 8 Minuten auf verschiedene Dosen ACTH nach der Student-Verteilung erhält man die standardisierte Veränderliche t nach

$$t = \frac{M_b - M_a}{\sqrt{\frac{n_b + n_a}{n_b + n_a - 2} \left[(\Delta M_b)^2 \frac{n_b - 1}{n_a} + (\Delta M_a)^2 \frac{n_a - 1}{n_b} \right]}}$$

Abb. 21 Eichkurve für ACTH (Synacthen^R)



Annähernd linearer Verlauf für ACTH-Dosen von 0 bis 0,5 mE, steilerer Anstieg für 0,5 bis 1,0 mE (vgl. auch Text).

wobei die Indizes a und b für die beiden zu vergleichenden ACTH-Dosen stehen. Bei bekanntem t und bekannter Anzahl der Freiheitsgrade $\nu = n_a + n_b - 2$ kann die tatsächliche Irr-

tums- oder Signifikanzwahrscheinlichkeit P aus entsprechenden Tabellen abgelesen werden (66).

So ergibt sich beispielsweise bei dem Vergleich der Corticosteronanstiege auf 0,9%ige Kochsalzlösung und auf 0,01 mE ACTH bei $t = 1,17808$ und $\gamma = 103 \quad 0,15 > P > 0,10$, d.h. kein signifikanter Unterschied, was unter anderem auf die geringe Anzahl von Versuchen mit physiologischer Kochsalzlösung zurückzuführen ist.

Die entsprechende Berechnung für 0,9%ige NaCl-Lösung und 0,025 mE ACTH zeigt bei $t = 2,6011$ und $\gamma = 31 \quad 0,01 > P > 0,005$, d.h. einen signifikanten Unterschied. Und schließlich ist der Corticosteronanstieg auf 0,025 mE ACTH von dem auf 0,01 mE ACTH bei $t = 3,034$, $\gamma = 116$ und $0,0025 > P > 0,0005$ hochsignifikant verschieden. An den letzten beiden Beispielen wird übrigens der Einfluß der Anzahl der Freiheitsgrade auf die Signifikanzschranken nach der Studentverteilung deutlich, die einen höher signifikanten Unterschied zwischen den Corticosteronanstiegen auf 0,01 mE und 0,025 mE ACTH, als zwischen denen auf 0,025 mE ACTH und 0,9%iger Kochsalzlösung ausweist.

VI. ACTH-Spiegel im menschlichen Plasma

1) Applikation von menschlichem Plasma in die Rattenaorta

Wie unter "METHODEN" beschrieben, erwies sich eine Infusion von zunächst 0,05 mE ACTH und 24 Minuten später von 1 ml Plasma als optimal, weil einmal der Corticosteronanstieg auf 0,05 mE ACTH gewisse Rückschlüsse auf die Sensibilität der Ratten gegenüber ACTH zuläßt und andererseits die oblige Applikation von 0,05 mE ACTH vor dem Plasma bei allen Versuchen eine annähernd gleichartige Ausgangssituation für die folgende Plasmaapplikation schafft. Die bei unseren ersten Versuchen angewandte Reihenfolge 0,01 mE ACTH -

Plasma - 0,10 mE ACTH - Plasma wurde bald verworfen, da der Corticosteronanstieg auf 0,10 mE ACTH weitgehend von der Höhe des ACTH-Spiegels in der vorher infundierten Plasma-
probe abhängig war, insbesondere dann, wenn die Corticosteroninkretion in das Nebennierenvenenblut nach ACTH-Mengen von mehr als 0,10 mE in 1 ml des zu untersuchenden Plasmas zum Zeitpunkt der Applikation der Testdosis von 0,10 mE ACTH noch nicht wieder auf den Ausgangswert abgesunken war.

Die nächste von uns untersuchte Modifikation bestand in der Reihenfolge 0,01 mE ACTH - 0,05 mE ACTH - Plasma. Es zeigte sich jedoch, daß bei dem minimalen Anstieg auf die Testdosis von 0,01 mE ACTH kein sicherer Rückschluß auf die Empfindlichkeit der Ratte möglich war und andererseits manche Ratte vor Ablauf der erforderlichen Versuchsdauer von 60 Minuten - von Beginn der ersten Blutsammelperiode an gerechnet - ad exitum kam. Der Großteil unserer Versuche wurde deshalb mit Infusionen in der Reihenfolge 0,05 mE ACTH - Plasma durchgeführt.

Die im vorigen Kapitel angegebene Eichkurve hätte bei dieser Versuchsanordnung folgerichtig auf Grund des Corticosteronanstieges nach ACTH-Testdosen gewonnen werden müssen, die an Stelle des Plasmas nach der ersten 0,05 mE ACTH-dosis appliziert worden waren. Der bei einem solchen Vorgehen zur Aufstellung einer statistisch gesicherten und verwertbaren Eichkurve nötige Aufwand schien durch die dadurch zu erzielende Verbesserung nicht gerechtfertigt, so daß wir uns entschlossen haben, für die Eichkurve alle zur Verfügung stehenden Corticosteronanstiege zu berücksichtigen, ungeachtet des Zeitpunktes der ACTH-Applikation im Rahmen des einzelnen Versuches. Die sich daraus ergebende Fehlerquelle dürfte durch die große Anzahl von Einzelwerten, die auf diese

Weise für die statistische Berechnung verwendet werden konnten, weitgehend kompensiert sein.

So errechneten sich beispielsweise die Mittelwerte des Corticosteronanstieges auf je 7 ACTH-Dosen von 0,05 und 0,10 mE, die jeweils nach vorangegangener Infusion von 0,05 mE ACTH verabreicht worden waren, zu $0,035 \pm 0,110 \mu\text{g}$ bzw.

$0,077 \pm 0,142 \mu\text{g}$ und zeigten damit eine weitgehende Übereinstimmung mit den entsprechenden Werten unserer Eichkurve, die bei $0,032 \pm 0,092 \mu\text{g}$ bzw. $0,071 \pm 0,210 \mu\text{g}$ liegen. Andere Autoren haben beobachtet, daß der Anstieg der Corticosteroninkretion bei wiederholter Applikation gleicher ACTH-Mengen nach der ersten ACTH-Infusion durchweg niedriger lag als bei den folgenden (23). Es erübrigt sich bei unserem Verfahren, das eine obligate 0,05 mE ACTH-Dosis vor der Applikation des zu untersuchenden Plasmas vorsieht, dieser Frage nachzugehen. Wir haben dennoch bei 11 Ratten die Corticosteronanstiege auf zweimalige Gaben gleicher Mengen ACTH verglichen und fanden sowohl für 0,01 mE ($n = 7$), als auch für 0,05 mE ($n = 4$) identische Corticosteronanstiege nach der ersten und zweiten Applikation. Es liegt auf der Hand, daß insbesondere der Corticosteronanstieg auf die erste ACTH-Dosis von dem seit der Hypophysektomie verflossenen Zeitraum abhängig ist, da bekanntermaßen die Sensibilität der Nebennierenrinde für ACTH hinsichtlich der Corticosteroidinkretion nach der Hypophysektomie ohne fortlaufende ACTH-Substitution rasch abnimmt (25). Es darf angenommen werden, daß 90 Minuten nach beendeter Hypophysektomie, zu einem Zeitpunkt also, an dem bei unserem Verfahren die erste ACTH-Applikation erfolgt, die Nebennierenrinde noch optimal ansprechbar für ACTH ist, während zu einem späteren Zeitpunkt eine vorangehende Anregung notwendig ist, um einen maximalen Corticosteronanstieg auf eine ACTH-Gabe zu gewährleisten. So hat vor kurzem

OHSAWA berichtet, daß bei 24 Stunden vorher hypophysektomierten Ratten durch intravenöse Applikation von 10 mE ACTH weitere zwei Stunden später die Empfindlichkeit der Nebennierenrinde gegenüber ACTH wieder auf die von der akut hypophysektomierten Ratte bekannte Größenordnung angestiegen war (47).

2) ACTH-Plasma-Spiegel bei Normalpersonen und bei Patienten mit Erkrankungen des Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems

Die Prüfung der zu untersuchenden Plasmen auf ihre ACTH-Aktivität erfolgte durch Zwei- bis Vierfachbestimmung des Corticosteronanstieges pro 8 Minuten bei verschiedenen Ratten. Die Umrechnung des Corticosteronanstieges auf die entsprechende ACTH-Menge geschah durch einfache Ablesung auf der ACTH-Eichkurve (s. Kap. V). Versuche, bei denen der Corticosteronanstieg auf die ACTH-Eichdosis außerhalb des Normalbereiches lag, wurden nicht berücksichtigt. Die in 1 ml des zu untersuchenden Plasmas enthaltene ACTH-Menge ergab sich als arithmetischer Mittelwert der im allgemeinen aus 2 - 4 Einzelbestimmungen errechneten ACTH-Mengen. Die Ergebnisse sind in Tab. 7 festgehalten.

Tab. 7 ACTH-Gehalt in 1 ml Plasma bei Normalpersonen und Patienten mit Erkrankungen des Hypophysen-Nebennierenrindensystems.

Bestimmung der ACTH- und "11-OH-CS"-Spiegel s. Text (vgl. auch METHODEN)

Patient/Erkrankung	Zeitpunkt und Ort der Entnahme	Anzahl der Versuche	ACTH/ml Plasma (mE)	"11-OH-CS" (γ%)
K. J., 49J., männl.	I zentral	3	< 0,01	
Epilepsie-Jackson-Anfälle	I peripher	2	0,01	36,5
	II zentral	3	< 0,01	23,0
B. J., 40J., männl.	I peripher*	3	< 0,01	
Genuine Epilepsie	I peripher	2	0,01	23,0
	II peripher*	2	< 0,01	18,0

Patient/Erkrankung	Zeitpunkt und Ort der Entnahme	Anzahl der Versuche	ACTH/ml Plasma (mE)	"11-OH-CS" (γ%)
W.M., 52J., männl. Prostatahypertro- phie	I zentral I peripher II zentral	3 2 2	< 0,01 0,02 < 0,01	 30,0 21,0
H.P., 19J., männl. Alimentäre Adipo- sitas	I zentral I peripher II zentral	2 2 2	0,01 < 0,01 0,02	 16,0 8,0
K.M., 36J., männl. Verdacht auf Myopathie	I zentral I peripher II zentral	2 2 3	< 0,01 < 0,01 < 0,01	 14,5 9,0
B.O., 47J., männl. Vegetative Be- schwerden	I zentral I peripher II peripher	1 2 2	0,01 < 0,01 < 0,01	 32,0 25,0
R.M., 20J., männl. Cerebraler Krampf- anfall nach Schä- deltrauma	I zentral I peripher II zentral	2 2 2	< 0,01 < 0,01 0,02	 24,0 15,0
L.J., 61J., männl. Bronchial-Ca, meta- stat, Zerstörung der Nebennieren und des Hypophysenvor- derlappens	I zentral I peripher II zentral	3 2 1	< 0,01 < 0,01 0,01	 3,0 6,0
E.T., 44J., weibl. Cushing-Syndrom, Zustand nach ein- seitiger Adrenal- ektomie	I zentral I peripher II zentral	2 2 2	< 0,01 < 0,01 < 0,01	 38,0 30,0
M.E., 44J., weibl. Zustand nach Total- adrenalektomie we- gen Cushing-Syn- drom	I zentral I peripher II peripher	2 2 2	0,06 0,03 0,05	 10,0 17,0
E.L., 19J., männl. Zustand nach Total- adrenalektomie we- gen Cushing-Syn- drom	I zentral I peripher II zentral	3 3 3	0,27 0,04 < 0,01	 5,0 8,0

Patient/Erkrankung	Zeitpunkt und Ort der Entnahme	Anzahl der Versuche	ACTH/ml Plasma (mE)	"11-OH-CS" (γ%)
B.S., 48J., männl.	I zentral	4	0,45	
Morbus Addison	I peripher	3	0,28	4,0
	II zentral	3	0,29	8,0
G.J., 18J., männl.	I zentral	2	0,26	
Morbus Addison	I peripher	2	0,24	7,0
	II zentral	2	0,02	7,0
W.L., 21J., weibl.	I zentral	2	0,80	
Adrenogenitales	I peripher	3	0,44	22,0
Syndrom	II zentral	2	0,06	14,0

Anm.: I = vor Dexamethason II = 60 Minuten nach Dexamethason

zentral = aus dem Bulbus cranialis venae jugularis

peripher = aus der Vena cubitalis

* Das Blut wurde wahrscheinlich statt aus dem Bulbus venae jugularis aus der Arteria carotis interna entnommen.

Die Mittelwerte des Corticosteronanstieges nach Applikation des Plasmas von Normalpatienten lagen für I zentral bei $-0,003 \pm 0,019 \mu\text{g}$ entsprechend $<0,01$ mE ACTH pro ml, für I peripher bei $+0,001 \pm 0,035$ Mikrogramm entsprechend $<0,01$ mE ACTH pro ml und für II zentral bei $+0,002 \pm 0,021$ Mikrogramm entsprechend $<0,01$ mE ACTH pro ml Plasma.

VII. Halbwertszeit des endogenen ACTH

Zur Aufrechterhaltung eines konstanten ACTH-Plasmaspiegels muß in der Halbwertszeit die Hälfte des im Organismus - mit Ausnahme der Hypophyse - befindlichen ACTH ersetzt, d.h. von der Hypophyse sezerniert werden (48, 49).

Es muß also gelten:

$$\text{ACTH}_{\text{peripher}} \cdot VV_{\text{ACTH}} \cdot 0,5 = (\text{ACTH}_{\text{zentral}} - \text{ACTH}_{\text{peripher}}) \cdot \text{HD} \frac{100 - \text{Hk}}{100} \cdot \text{HWZ},$$

wobei

$ACTH_{\text{peripher}}$ bzw. $ACTH_{\text{zentral}}$ = ACTH-Menge in 1 ml Plasma aus der Vena cubitalis bzw. aus dem Bulbus cranialis venae jugularis in mE/ml.

VV = Verteilungsvolumen in ml, d. i. dasjenige fiktive Volumen, in dem das gesamte im Organismus - mit Ausnahme der Hypophyse - vorhandene ACTH gleichmäßig verteilt sein müßte, um in der gleichen Konzentration wie im peripheren Plasma vorzuliegen. Es wurde aus der Abfallkurve von ^{131}Jod -markiertem ACTH im menschlichen Plasma durch Extrapolation auf den Zeitpunkt der Applikation, zu 43 % des Körpergewichts berechnet (68).

HD = Hirndurchblutung pro Minute in ml, nach BERNSMIEIER und Mitarbeitern (34) etwa gleich 15 % des Herzminutenvolumens bzw. rund 800 ml/min. (33).

Hk = Haematokrit, hier angenommen mit 45 %

HWZ=Halbwertszeit des ACTH in Minuten

Die linke Seite der Gleichung steht für die Hälfte des im gesamten Organismus - mit Ausnahme der Hypophyse - befindlichen ACTH, die rechte für die in der Halbwertszeit von der Hypophyse sezernierte ACTH-Menge, wobei vorausgesetzt wird, daß die gesamte von der Hypophyse abgegebene ACTH-Menge über den Bulbus cranialis venae jugularis in die Peripherie gelangt und andererseits der ACTH-Spiegel in der Vena cubitalis repräsentativ für das gesamte extracerebrale Blutgefäßsystem ist, angenommen die vom Bulbus cranialis venae jugularis zum rechten Herzvorhof führende Strombahn (vgl. bei "METHODEN" über Plasmagewinnung).

Durch Umformen der Gleichung erhält man

$$HWZ \text{ (min.)} = \frac{ACTH_{\text{peripher}} \cdot VV_{ACTH} \cdot 0,5}{(ACTH_{\text{zentral}} - ACTH_{\text{peripher}}) \cdot HD \frac{100-Hk}{100}}$$

Zur zahlenmäßigen Berechnung der Halbwertszeit auf Grund der von uns ermittelten ACTH-Spiegel können lediglich die gegenüber der Norm erhöhten ACTH-Menge pro ml Plasma herangezogen werden, da die bei Normalpatienten gefundenen Werte von $< 0,01$ mE/ml nicht hinreichend genau definiert sind.

Die zur Berechnung verwertbaren Daten sind in Tab. 8 zusammengefaßt:

Tab. 8 ACTH-Mengen pro ml Plasma, Körpergewicht und Verteilungsvolumen von Patienten mit erhöhten ACTH-Spiegeln

Patient	ACTH _{zentral} (mE/ml)	ACTH _{peripher} (mE/ml)	Körpergewicht (kg)	Verteilungsvolumen (l)
M.E.	0,06	0,03	82,0	35,3
E.L.	0,27	0,04	50,5	21,7
B.S.	0,45	0,28	67,3	28,9
G.J.	0,26	0,24	55,5	23,9
W.L.	0,80	0,44	50,0	21,5
Mittelwerte	0,368 (n = 13)	0,206 (n = 13)	61,1	26,3

Durch Einsetzen dieser Mittelwerte in die obenstehende Gleichung erhält man

$$\text{HWZ (min.)} = \frac{0,206 \cdot 26300 \cdot 0,5}{(0,368 - 0,206) \cdot 800 \cdot \frac{100-45}{100}} = 38,0 \text{ min.}$$

Nimmt man für das periphere Plasma von Normalpersonen eine mittlere ACTH-Menge von $0,005$ mE/ml an (25), so errechnet sich nach Umformen der Gleichung und Einsetzen der oben mit 38 Minuten angegebenen Halbwertszeit die ACTH-Menge im Plasma aus dem Bulbus cranialis venae jugularis zu $0,009$ mE/ml. Da beide Werte unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze unserer Bestimmungsmethode liegen, kann ein Unterschied zwischen zentralen und peripheren ACTH-Plasmaspiegeln in diesem Fall

nicht festgestellt werden. Selbst bei einer ACTH-Menge von 0,01 mE/ml peripheren Plasmas wäre der entsprechende zentrale Wert mit 0,018 mE/ml noch nicht signifikant davon zu unterscheiden.

Umgekehrt wäre ein signifikanter Unterschied zwischen wenig über dem Normbereich liegenden zentralen und peripheren ACTH-Spiegeln erst bei kürzeren Halbwertszeiten zu erwarten. So würde sich beispielsweise für 0,01 mE/ml peripher und 0,025 mE/ml zentral unter Beibehaltung aller übrigen Faktoren eine Halbwertszeit von 19,7 Minuten errechnen.

Diese theoretischen Überlegungen stehen in Einklang mit unserem Befund, daß die Plasma-ACTH-Spiegel sowohl im Bulbus cranialis venae jugularis, als auch in der Vena cubitalis unter 0,01 mE/ml lagen und keine meßbare Differenz erkennen ließen.

Ob allerdings für normale ACTH-Spiegel die durchweg aus erhöhten ACTH-Spiegeln errechnete Halbwertszeit ebenfalls Gültigkeit besitzt, kann mit unserer Methode aus dem genannten Grunde nicht nachgeprüft werden, erscheint jedoch nach vorliegenden Berichten über Versuche mit hohen Dosen von exogenem ACTH zumindest fraglich (43, 69).

VIII Kasuistik

Der normale ACTH-Plasmaspiegel war - wie bereits im vorigen Kapitel gezeigt - mit Hilfe der von uns verwandten biologischen Methode weder im Blut aus der Vena cubitalis noch in dem aus dem Bulbus cranialis venae jugularis zu erfassen.

Zur Untersuchung von Krankheitsbildern, die auf Störungen im Hypophysen-Nebennierenrinden-System beruhen, erwies sich die von uns verwandte Methode jedoch als brauchbar, da bekanntermaßen viele dieser Erkrankungen mit einer Erhöhung des ACTH-Spiegels im Plasma einhergehen. Erhöhte ACTH-Spiegel sind jedoch mit dieser Methode eindeutig zu erfassen. Im folgenden sollen die Ergebnisse der ACTH-Bestimmung und die Werte der

sog. "11-Hydroxycorticosteroide" (s. METHODEN) im Plasma bei sieben Patienten mit Erkrankungen im Bereich der Hypophyse oder der Nebennierenrinde im Zusammenhang mit den dazugehörigen Krankengeschichten kurz dargestellt werden (ACTH- und "11-OH-CS"-Spiegel s. Tab. 7):

Die 44-jährige Patientin E.T. bot bei der ersten Untersuchung in unserer Klinik das Vollbild eines Cushing-Syndroms. Tagesrhythmik und Suppressibilität des "11-Hydroxycorticosteroid"-Spiegels im Plasma sind in Abb. 15a, 15b aufgezeichnet. Die Erkrankung war anamnestisch über 10 Jahre zurückzuverfolgen, ohne daß wegen der Indolenz der Patientin therapeutische Maßnahmen ergriffen worden wären. Die von uns bestimmten ACTH-Spiegel im Plasma wurden nach einer zwischenzeitlich durchgeführten einseitigen Adrenalektomie gewonnen. Die pathologisch-histologische Beurteilung des entnommenen Präparates lautete: Rindenadenom der linken Nebenniere. Keine Atrophie des Nebennierengewebes. Knotige Zellproliferate (Pathologisches Institut der Universität München, Direktor Prof. Dr. BÜNGELER). Die "11-Hydroxy-Corticosteroide" im Plasma waren zu diesem Zeitpunkt ebenso wie die Cortisolausscheidung im 24-Stunden-Urin noch deutlich erhöht. Die gefundenen ACTH-Mengen lagen dagegen unter 0,01 mE/ml Plasma, was durchaus mit den Angaben anderer Autoren über ACTH-Spiegel bei Cushing-Syndrom übereinstimmt (25-28, 43, 46).

Der 19-jährige Patient E.L. wurde vor drei Jahren wegen eines Cushing-Syndroms mit Nebennierenrindenhyperplasie total-adrenalektomiert. Die Folge war ein vollständiges Verschwinden der typischen Krankheitssymptome und Auftreten einer intensiven Hautpigmentation sowie die Umkehrung der vorher latent diabetischen Stoffwechsellage in eine erhöhte Glucosetoleranz (70, 71) trotz Substitution von 30 mg Cortisol und 0,1 mg 9 α -Fluor-Cortisol-Acetat (Florinef^R-Acetat) - d. i. ein oral appli-

zierbares Präparat mit Mineralocorticoidwirkung - täglich. Röntgenologisch war ein doppelt konturierter Sellaboden nachweisbar, was den Verdacht auf das Vorliegen eines sog. chromophoben Adenoms (72-77) der Hypophyse nahelegte (48, 71, 78). Die "11-OH-CS" waren - bei Absetzen der Cortisolsubstitution 24 Stunden vor der Blutentnahme - gegenüber denen unserer Normalpatienten deutlich erniedrigt, der ACTH-Spiegel wies mit 0,27 mE/ml Plasma im Bulbus cranialis venae jugularis eine deutliche Erhöhung auf. Auffallend war die große Differenz zwischen zentralem und peripherem ACTH-Spiegel und der ausgeprägte Abfall nach Dexamethasoninfusion (57, 75-77, 79-81).

Eine 44-jährige Patientin M.E. mit einer gleichartigen Vorgeschichte, jedoch ohne nachweisbare Veränderungen der Sella turcica zeigte nur mäßig erhöhte ACTH-Spiegel bei noch im unteren Normbereich liegenden "11-OH-CS"-Werten, was wahrscheinlich durch die Tatsache erklärt wird, daß in diesem Falle nicht wie sonst üblich die Corticoidssubstitution 24 Stunden vor der Blutentnahme unterbrochen, sondern mit 3 x 10 mg Cortisol und 0,1 mg 9 α -Fluor-Cortisol-Acetat täglich bis zum Vorabend des Untersuchungstages fortgeführt worden war.

Bei dem 48-jährigen Patienten B.S. ist seit 14 Jahren ein Morbus Addison bekannt, der wahrscheinlich als Folgezustand einer vor 33 Jahren durchgemachten Tuberkulose mit feuchter Rippenfellentzündung und Urogenital-Tbc anzusehen ist. Die Behandlung erfolgte bis zur Einlieferung in unsere Klinik mit Desoxycorticosteron. Der Patient wies ein intensiv braunes Hautkolorit und eine nicht selten bei ungenügend substituierten Addisonkranken zu beobachtende Verkalkung der Ohrknorpel (THORNSches Zeichen) auf (82). Die Corticoidssubstitution wurde von uns auf 30 mg Cortisol und 0,1 mg 9 α -Fluor-Cortisol-Acetat täglich umgestellt. Die ACTH-Werte dieses Patienten waren bei erniedrigtem

"11-OH-CS"-Spiegel stark erhöht und durch rasche Dexamethason-infusion nur unvollständig zu supprimieren.

Der 18-jährige Patient G. J. erkrankte vor eineinhalb Jahren mit Inappetenz, Müdigkeit und Konzentrationsschwäche. Nach Behandlung mit 3 x 5 mg Prednisolon bildeten sich diese Symptome zusammen mit einer inzwischen aufgetretenen Hautpigmentation nahezu vollständig zurück. Auch bei diesem Addison-Patienten waren die ACTH-Werte bei niedrigem "11-OH-CS"-Spiegel stark erhöht, konnten jedoch durch Dexamethason weitgehend gesenkt werden.

Bei der jetzt 21-jährigen Patientin W. L. wurde vor 5 Jahren anlässlich eines ersten Klinikaufenthaltes ein adrenogenitales Syndrom mit primärer Amenorrhoe und Clitorishypertrophie diagnostiziert. Zur Anamnese ist bekannt, daß im 12. Lebensjahr erstmals eine zunehmende Behaarung an den Beinen und auf der Oberlippe bemerkt wurde. Zur gleichen Zeit begann auch ein auffallendes Wachstum der Clitoris. Eine bei dem ersten Klinikaufenthalt vorgenommene chromosomale Geschlechtsbestimmung ergab einen eindeutig weiblichen Typus. Die 17-Ketosteroide im Urin lagen bei 61 mg pro 24 Stunden, nach dreitägigem Hemmtest mit 3 mg Dexamethason täglich bei 4,4 mg pro 24 Stunden und stiegen nach weiteren 4 Tagen wieder auf 22 mg pro 24 Stunden an. Die Gonadotropine lagen im Normbereich, die 17-Hydroxysteroidstadien stiegen unter ACTH nur geringfügig an. Die Sella war röntgenologisch unauffällig. Der Blutdruck betrug 130/90 mm Hg. Eine damals eingeleitete Behandlung mit Dexamethason wurde von der indolenten Patientin nach kurzer Zeit abgebrochen.

Wir fanden bei der Patientin jetzt bei praktisch unverändertem Befund gegenüber der ersten stationären Untersuchung extrem hohe, durch Dexamethason weitgehend suppressible ACTH-Werte bei im Normbereich liegendem "11-OH-CS"-Spiegel.

Der für ein adrenogenitales Syndrom überraschend hohe $^{11}\text{-OH-CS''}$ -Spiegel dürfte wahrscheinlich zum Teil auf fluoreszierende Intermediär- oder Abbauprodukte der Steroidhormone zurückzuführen sein, die sich wegen der teilweise blockierten 21-Hydroxylierung in unphysiologisch großer Menge im Plasma finden (83).

Zum weiteren Krankheitsverlauf wäre zu berichten, daß nach einer im März 66 erneut begonnenen Substitutionsbehandlung mit täglich 1,5 mg Dexamethason Mitte Mai 66 erstmals eine Periodenblutung von einem Tag Dauer auftrat. Eine Kontrolle der ACTH- und $^{11}\text{-OH-CS''}$ -Werte im peripheren Blut ergab im Juni 66, d. i. drei Monate nach der ersten Bestimmung, ACTH-Mengen von weniger als 0,01 mE/ml Plasma und einen $^{11}\text{-OH-CS''}$ -Spiegel von 4 $\gamma\%$.

Ein diagnostisch interessantes Problem stellte sich bei dem 61-jährigen Patienten L. J., der unter dem Bild zunehmender Appetitlosigkeit, Benommenheit und Adynamie an einem Bronchial-Carcinom erkrankt war. Wegen der im Vordergrund stehenden Symptome der Hypotonie, Hyponatriämie und Adynamie dachten wir zunächst an eine durch Nebennieren-Metastasen des Bronchial-Carcinoms bedingte Nebennierenrindeninsuffizienz. Erst die unter 0,01 mE/ml Plasma liegenden ACTH-Spiegel bei erniedrigten $^{11}\text{-OH-CS''}$ -Werten ließen uns an eine sekundäre Nebennierenrindeninsuffizienz als Folge einer metastatischen Zerstörung des Hypophysenvorderlappens denken. Dazu paßten auch diskrete Zeichen einer Hypothyreose, wie Kälteempfindlichkeit und Bradycardie. Die Autopsie bestätigte beide Vermutungen. Es fand sich eine weitgehende Zerstörung des Hypophysenvorderlappens und beider Nebennieren durch Metastasen eines Plattenepithel-Carcinoms der Lunge.

DISKUSSION

In der EINLEITUNG wurde bereits darauf hingewiesen, daß zur Zeit eine Aussage über ACTH-Aktivitäten im menschlichen Plasma nur mit Hilfe einer biologischen Bestimmungsmethode zu gewinnen ist. Die Qualität einer biologischen Bestimmungsmethode ist im wesentlichen abhängig von der Genauigkeit, der Empfindlichkeit, der Spezifität und m. E. der Aufwendigkeit des Verfahrens.

Wie unter ERGEBNISSEN ausgeführt, läßt sich die Genauigkeit des von uns verwandten Verfahrens mit einem Genauigkeitsindex von $\Lambda = 0,071$ charakterisieren. Dieser Wert darf beim Vergleich mit den Werten anderer Autoren sowohl für die ACTH-Bestimmung (37,43-45), als auch für biologische Bestimmungen anderer Hormone (67) als sehr zufriedenstellend bezeichnet werden. Man darf dabei jedoch nicht übersehen, daß einem einzelnen Wert des Corticosteronanstieges auf ein unbekanntes Plasma eine große Spanne nach den Vertrauensbereich zuzuordnender ACTH-Werte entspricht, so daß nur bei einer genügend großen Anzahl an Bestimmungen eines jeden Plasmas einigermaßen zuverlässige Werte gewonnen werden können.

Zu dem nicht unerheblichen Aufwand des Verfahrens, der in der mitgeteilten Form zwei eingearbeiteten Personen täglich im Höchstfall 4 Ratten bzw. Plasmawerte zu untersuchen erlaubt, tritt erschwerend die Notwendigkeit, wegen der raschen Abnahme der ACTH-Aktivität in eingefrorenen Standardlösungen und Plasmen die einmal gewonnenen Plasmaproben innerhalb möglichst kurzer Zeit zu verarbeiten.

Wir fanden als Ausdruck für die Empfindlichkeit der Methode eine Schwellendosis zwischen 0,01 und 0,015 mE ACTH für einen signifikanten Corticosteronanstieg (vgl. ERGEBNISSE). Dieser Wert stimmt mit den in der Literatur angegebenen praktisch überein (22, 23,46). Es sei betont, daß diese Empfindlichkeitsschwelle bei der von uns geübten intraaortalen Applikation (23,48,49) wie auch bei der von LIPSCOMB und NELSON durchgeführten retrograden Applikation über die Vena adrenalıs gefunden wurde. PFEIFFER und Mitar-

beiter geben diese hohe Sensibilität auch für die periphervenöse Applikationsart an. Man wird dabei allerdings die relativ großen Volumina an verabfolgtem Plasma und den damit verbundenen starken Einfluß auf die Nebennierendurchblutungs- und damit auf die Steigerung der Corticosteroninkretion (64, 65) berücksichtigen müssen.

Außer diesem unspezifisch-additiven Effekt der Nebennierendurchblutung besteht eine praktisch absolute Spezifität der Bestimmungs-
methode für ACTH, da unter den gewählten Bedingungen bei der hypophysektomierten Ratte eine unspezifische Steigerung der Corticosteroninkretion nicht vorstellbar ist.

Für biologische Bestimmungsmethoden fordert man häufig eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der gegebenen Dosis und deren Wirkung (44, 62). Dieses Postulat besteht hauptsächlich, weil man einen größeren Dosisbereich mit einer Eichkurve erfassen möchte, sagt aber nichts über die Richtigkeit der Dosis-Wirkungsbeziehung aus (67). Unter den von uns gewählten Bedingungen fand sich eine lineare Beziehung zwischen Dosis und Wirkung. Unter ERGEBNISSEN wurde bereits ausgeführt, daß man in einem Zeitraum von acht Minuten nach Applikation einer ACTH-Standardlösung oder einer Plasmaprobe nur einen je nach Größe der ACTH-Dosis wechselnd großen Anteil der Zunahme der Corticosteroninkretion erfaßt. Es liegt auf der Hand, daß bei der beschriebenen Dynamik der Corticosteroninkretion nach ACTH ein anders gewählter Sammelzeitraum eine Änderung der Dosis-Wirkungs-Kurve zur Folge haben müßte. Würde man unmittelbar nach der ACTH-Applikation gelegene Sammelperioden successive verkürzen, so käme man schließlich zu einer linearen Beziehung zwischen dem Logarithmus der Dosis und der einfachen Wirkung, müßte aber auf die vollständige Erfassung der Steigerung der Corticosteroninkretion bei kleinsten ACTH-Dosen verzichten, was die Empfindlichkeit der Methode verschlechtern würde. Umgekehrt erhält man bei Berücksichtigung des gesamten ACTH-bedingten Anstiegs der Corticosteroninkretion bis zu einer ACTH-Dosis

von etwa 1,0 mE eine lineare Beziehung zwischen der einfachen Dosis und einem Logarithmus der Wirkung (vgl. Abb. 18).

Die offenbar unvollständige Suppression der Plasmaspiegel der sog. "11-Hydroxy-Corticosteroide" eine Stunde nach rascher Infusion von Dexamethason kann verschiedene Ursachen haben:

Eine erste Erklärungsmöglichkeit bietet die unter ERGEBNISSEN berechnete Halbwertszeit für endogenes ACTH. Sie liegt mit 38 Minuten erheblich über der von vielen Autoren gefundenen Halbwertszeit für exogenes ACTH von nur wenigen Minuten (43, 68, 84-86). Nur PFEIFFER fand bei langsamer Infusion von 25 E ACTH eine Halbwertszeit von 29 Minuten (43, 69). Es darf in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen werden, daß alle uns bekannten Untersuchungen über Halbwertszeiten von ACTH mit exogenem ACTH durchgeführt wurden, so daß unsere Berechnungen geeignet sind, trotz mancher kritischen Einwände (s. ERGEBNISSE) die Halbwertszeit für endogenes ACTH erstmals wenigstens größenordnungsmäßig zu erfassen.

Bei einer Halbwertszeit von ca. 40 Minuten ist eine Stunde nach Dexamethasoninfusion, die über eine Hemmung der ACTH-Inkretion des Hypophysenvorderlappens oder besser der Inkretion eines "Corticotropin-Releasing-Factor" aus dem Hypothalamus (58-61) zu einer Verminderung der Corticosteroidinkretion aus der Nebennierenrinde führt, noch mit einem ACTH-Spiegel von ca. 35 % des Ausgangswertes vor Dexamethason zu rechnen, selbst wenn durch die Dexamethasoninfusion die ACTH-Inkretion des Hypophysenvorderlappens tatsächlich prompt und vollständig blockiert wird, wie das von YALOW (30) postuliert wurde.

Eine andere zu diskutierende Erklärung für die unvollständige Suppression der "11-Hydroxy-Corticosteroide" eine Stunde nach Dexamethasoninfusion wäre die mit etwa 160 Minuten angegebene Halbwertszeit der Corticosteroide im Plasma (87, 88).

Neben diesen physiologischen Aspekten muß schließlich eine methodische Fehlerquelle berücksichtigt werden: Die Zunahme der sog. "11-Hydroxy-Corticosteroide" bei Addison-Patienten nach Dexamethason-Infusion (Tab. 3) läßt sich eigentlich nur mit der Annahme erklären, daß bestimmte Stoffwechselprodukte des Dexamethason bei der von uns angewandten Methode (54) fluoreszieren, während die Reinsubstanz das nicht tut (52, 53). Überlegungen über die zirkulatorischen Verhältnisse lassen erkennen, daß nur ein kleiner Teil des intraaortal applizierten ACTH bis zur Beendigung der Blutsammelperiode in die Nebennierenrinde der Ratte gelangt. Auch beim Menschen dürfte der Anteil der adrenalen Durchblutung am Herzminutenvolumen unter 1 % liegen. Es ist bekannt, daß auf der einen Seite geringfügige Schwankungen des ACTH-Plasmaspiegels beim Gesunden genügen, um die physiologischen Anpassungen der Corticosteroidinkretion zu ermöglichen (25) und daß andererseits beim Nebennierenrindeninsuffizienten bis zu 2 Zehnerpotenzen höhere ACTH-Mengen den Organen und Geweben auf dem Blutweg angeboten werden, wodurch extraadrenale Wirkungen wie Lipolyse, Melanocytenstimulation etc. (89) des ACTH wirksam werden können, die bei physiologischen ACTH-Konzentrationen wahrscheinlich keine große Rolle spielen. Daß bei Addisonpatienten oder wegen eines Cushing-Syndroms Adrenalektomierten ACTH-Spiegel gemessen werden, die um 2 Zehnerpotenzen höher sind als beim Normalen, ist aus der Literatur gut bekannt (25, 43). Der von verschiedenen Autoren ermittelte normale Gehalt des Hypophysenvorderlappens an ACTH liegt in der Größenordnung von 120 E (90), so daß eine unter pathologischen Bedingungen gesteigerte ACTH-Sekretion von 80 - 100 E pro Tag (48-49) - gegenüber 4 E pro Tag als Normalwert (81) - durchaus möglich erscheint. Derartig extreme Unterschiede zwischen physiologischen und pathologisch gesteigertem Hormongehalt im Plasma kennt man von anderen endokrinen Erkrankungen, ohne daß eine Krise vorliegt (71), unseres Wissens nicht.

Es besteht allerdings möglicherweise ein Unterschied zwischen den "Corticotropin-Releasing-Factors", welche die erhöhten ACTH-Spiegel beim Addisonpatienten einerseits und bei wegen eines Cushing-Syndroms Adrenalektomierten andererseits hervorrufen. Nach Adrenalektomie wurde seit 1958 wiederholt über das Auftreten sog. chromophober Adenome berichtet (75, 76). Diese Tumoren werden nach KRACHT besser als R-Zellen-Adenome bezeichnet und finden sich nicht bei Addisonpatienten (91). Es liegt deshalb die Vermutung nahe, daß bei manchen adrenalektomierten Cushing-Kranken ein zusätzlicher Corticotropin-Releasing-Factor mit speziell das Wachstum bestimmter Zellen fördernder Wirkung produziert wird.

Das in dieser Arbeit beschriebene Verfahren zur biologischen Bestimmung von ACTH-Aktivitäten im Plasma hat uns in Einzelfällen wesentliche klinische Beobachtungen ermöglicht und erlaubt darüber hinaus endokrinologisch interessante Berechnungen und Überlegungen. Die Methoden zur ACTH-Bestimmung werden jedoch in Zukunft vereinfacht und verbessert werden müssen, wenn insbesondere die dynamischen Gesichtspunkte der ACTH-Inkretion und -Verteilung intensiver erforscht werden sollen.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine biologische Methode zur Bestimmung der ACTH-Aktivität in 1 ml nativem, menschlichem Plasma beschrieben.

Der methodische Teil der Arbeit enthält eine detaillierte Beschreibung der parapharyngealen Hypophysektomie sowie der Kanülierung der Nebennierenvene der Ratte. Als Indikator der ACTH-Wirkung dient der fluorimetrisch gemessene Anstieg der Corticosteroninkretion in das Nebennierenvenenblut hypophysektomierter Ratten. Eine kritische Erprobung der fluorimetrischen Bestimmungsmethode wird beschrieben.

Das angewandte Verfahren erlaubt, ACTH-Dosen von 0,010 - 0,015 mE gerade noch zu erfassen. Die statistische Auswertung der Ergebnisse ergab einen für eine biologische Bestimmungsmethode recht zufriedenstellenden Genauigkeitsindex von $\text{Lambda} = 0,07$.

Es zeigte sich, daß mit der beschriebenen Methode weder im Blut aus der Vena cubitalis, noch in dem aus dem Bulbus cranialis venae jugularis normale ACTH-Spiegel sicher erfaßt werden können. Bei Patienten mit pathologisch gesteigertem ACTH-Spiegel, deren Krankengeschichten epikritisch wiedergegeben werden, sind die ACTH-Mengen im Plasma aus dem Bulbus cranialis venae jugularis signifikant gegenüber den ACTH-Mengen im Plasma aus der Vena cubitalis erhöht. Aus dem Verhältnis dieser beiden Werte läßt sich die Halbwertszeit endogenen ACTH's näherungsweise mit 38 Minuten berechnen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. SMITH, PH. E.: Hypophysectomy and a replacement therapy in the rat
Amer. J. Anat. 45, 205 (1930)
2. COLLIP, J. B., E. M. ANDERSON, and D. L. THOMSON: The adrenotropic hormone of the anterior pituitary lobe
Lancet 347, II (1933)
3. COLLIP, J. B.: 7. Mt. Sinai Hosp. 1, 28 (1934)
4. ANSELMINO, K. J., F. HOFFMANN und L. HEROLD: Das corticotrope Hormon des Hypophysenvorderlappens
Arch. Gynaekol. 157, 86 (1934)
5. ANSELMINO, K. J., F. HOFFMANN und L. HEROLD: Über das corticotrope Hormon des Hypophysenvorderlappens
Klin. Wschr. 12, 209 (1934)
6. EVANS, H. M.: Present position of our knowledge of anterior pituitary function
J. Amer. Med. Ass. 101, 425 (1933)
7. LI, C. H., H. M. EVANS and M. E. SIMPSON: Isolation of adrenocorticotrophic hormone from sheep-pituitaries
Science 96, 450 (1942)
8. LEVY, A. L., J. J. GESCHWIND, and C. H. LI: Corticotropins (ACTH) II. Amino acid composition of α -corticotropin
J. Biol. Chem. 213, 187 (1955)
9. LI, C. H., J. J. GESCHWIND, R. D. COLE, J. D. RAACKE, J. I. HARRIS, and J. S. DIXON: Amino-acid sequence of α -corticotropin
Nature 176, 687 (1955)
10. LEVY, A. L., and C. H. LI: Corticotropins (ACTH) III. Kinetic studies on the reaction of N-terminal group reagents with α -corticotropin, an N-terminal group analysis
J. Biol. Chem. 243, 487 (1955)
11. HARRIS, J. I., and C. H. LI: Corticotropins (ACTH) IV. The action of carboxy-peptidase on α -corticotropin, and the C-terminal amino acid sequence
J. Biol. Chem. 213, 499 (1955)
12. GESCHWIND, J. J., and C. H. LI: Corticotropins (ACTH) V. The application of oxidation with periodate to the determination of N-terminal serine in α -corticotropin
Biochem. et Biophys. Acta 15, 442 (1954)

13. COLE, R.D., C.H. LI, J.I. HARRIS, and N.G. PON: Corticotropins (ACTH) VIII. The action of pepsin on α -corticotropin and the C-terminal amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 219, 903-916 (1956)
14. LI, C.H., J. MEIEN-HOFER, E. SCHNABEL, D. CHUNG, T. LO, and I. RAMACHANDRAN: Synthesis of a biologically active nonadecapeptide corresponding to the first nineteen amino acid residues of adrenocorticotropins. *J. Am. Chem. Soc.* 83, 4449-4457 (1961)
15. SCHULER, W., B. SCHÄR und P. DESAULLES: Zur Pharmakologie eines ACTH-wirk-samen, vollsynthetischen Polypeptids, des β 1-24-Corticotropins, Ciba 30920-Ba, Synacthen. *Schweiz. Med. Wschr.* 93, 1027 (1963)
16. SCHWYZER, R. und H. KAPPELER: Synthese eines Tetracosapeptides mit hoher corticotroper Wirksamkeit: β 1-24-Corticotropin. *Helvetica Chim. Acta.* 46, 1550 (1963)
17. SCHWYZER, R. und P. SIEBER: Total synthesis of adrenocorticotrophic hormone. *Nature* 199, 172 (1963)
18. HOFMANN, K., and H. YAJIMA: Synthetic Pituitary Hormones *Rec. Progr. in Horm. Res.* 18, 62 (1962) Edited by Gregory Pincus Academic Press, NY and London (1962)
19. SAYERS, M.A., G. SAYERS and L.A. WOODBURY: Endocrinology 42, 379 (1949) The assay of adrenocorticotropic hormone by the adrenal ascorbic acid depletion method
20. MUNSON, P.L., and W. TOEPEL: Detections of minute amounts of adreno-corticotropic hormone by the effect on adrenal venous ascorbic acid. *Endocrinology* 63, 785 (1958)
21. SAFFRAN, M., and A.V. SHALLY: Endocrinology 56, 523 (1955)
22. LIPSCOMB, H.S., and D.H. NELSON: A sensitive biologic assay for ACTH *Endocrinology* 71, 13 (1962)
23. GIRARD, F., and V.K. VANCE: Modification of the Lipscomb-Nelson bio-assay for ACTH. *Endocrinology* 71, 325 (1962)
24. ZENKER, N., and D.E. BERNSTEIN: The estimation of small amounts of corticosterone in rat plasma. *J. Biol. Chem.* 231, 695 (1958)

25. LIDDLE, G.W., D. ISLAND, Normal and abnormal regulation of
and C.K. MEADOR: corticotropin secretion in man
Rec. Progr. Horm. Res. 18, 125
(1962)
26. VANCE, V.K., W.J. REDDY, ACTH in human plasma
D.H. NELSON, and J. clin. Invest. 41, 20 (1962)
G.W. THORN:
27. NEY, R.L., N. SHIMIZU, Correlation of plasma ACTH concen-
W.E. NICHOLSON, tration with adrenocortical response
D.P. ISLAND, and in normal human subjects, surgical
G.W. LIDDLE: patients, and patients with Cushing's
disease
J. clin. Invest. 42, 1669 (1963)
28. WILLIAMS, W.L., Blood corticotropin (ACTH) levels in
D. ISLAND, R.A.A. OLD- Cushing's disease
FIELD, and G.W. LIDDLE: J. clin. Endocrin. 21, 426 (1961)
29. DAVIES, B.M.A.: Blood corticotrophin in normal adults
and in patients with Cushing's syn-
drome
Acta Endocrin. 45, 55 (1964)
30. YALOW, R.S., S.M. GLICK, Radioimmunoassay of human plasma
J. ROTH, and S.A. BERSON: ACTH
J. clin. Endocrin. 24, 1219 (1964)
31. FELBER, J.P., A.J. MOODY, Determination radio-immunologique
A. VILLANUEVA et de l'insuline et de l'ACTH en
A. VANOTTI: clinique
Bull. Schweiz. Akad. med. Wiss. 21,
261 (1965)
32. IMURA, H., L.L. SPARKS, Immunologic studies of adrenocortico-
G.M. GRODSKY, and tropic hormone (ACTH). Dissociation
P.H. FORSHAM: of biologic and immunologic activities.
J. clin. Endocrin. 25, 1361 (1965)
33. KETY, S.S., and The nitrous oxide method for the
C.F. SCHMIDT: quantitative determination of cerebral
blood flow in man: Theory, procedure
and normal values
J. clin. Invest. 27, 476 (1948)
34. BERNSTEIN, A., Herzkrankheiten als Ursache zerebra-
U. GOTTSTEIN und ler Zirkulationsstörungen
W. RUDOLPH: Dt. med. Wschr. 87, 16 (1962)
35. FREUD, J.: Die Hypophysektomie. In "Handbuch
der biologischen Arbeitsmethoden".
Herausg. E. ABDERHALDEN, Abt. V,
Teil 3BII, S. 1442, Urban und Schwar-
zenberg, Berlin (1938)

36. HARRISON, R.G., The adrenal circulation
and M.J. HOEY: Blackwell Scientif. Public. Oxford (1960)
37. PFEIFFER, E.F., ACTH-Bestimmung mittels Messung des
W.E. VAUBEL, Plasma-Corticosterons der mit Dexa-
K. RETIENE, D.BERG methason hypophysenblockierten Ratte
und H.DITSCHUNEIT: Klin. Wschr. 38, 980 (1960)
38. REDGATE, E.S., Sources of error in the bio-assay of ACTH
N.O. OHSAWA, in the rat
J. BUTTE, and Endocrinology 78, 644 (1966)
C.K. PHEBUS:
39. BARTHE, P., Biological activity of synthetic β -cortico-
P.A. DESAULLES, tropin
B. SCHÄR, and Nature 202, 908 (1964)
M. STAEHELIN:
40. KARL, H.J.: Adrenocorticotrope Wirkung eines voll-
synthetischen Tetracosapeptides- β 1-24-
Corticotropin- beim Menschen
Klin. Wschr. 41, 633 (1963)
41. WIEBEL, J. und Vergleichende Untersuchungen über die
J.R. BIERICH: Wirksamkeit eines synthetischen Cortico-
tropins β 1-24
Dt. Med. Wschr. 90, 1133 (1965)
42. RERUP, C.: The bioassay of corticotrophin A. With
special regard to the effect after sub-
cutaneous administration
Acta Endocrin. Suppl. 42 (1958)
43. PFEIFFER, E.F., Exogene und endogene ACTH-Aktivitäten
F. GARMENDIA, im nativen Plasma des Menschen
E. VAUBEL und Erg. Inn. Med., N.F. 20, 127 (1963)
K. RETIENE:
44. RETIENE, K., Corticotropin-Bestimmung anhand des
H. DITSCHUNEIT, Corticosteron-Anstieges im Nebennieren-
M. FISCHER, venenblut hypophysektomierter Ratten.
K. KOPP und Vergleich von Dexamethasonblockade und
E.F. PFEIFFER: Hypophysektomie
Acta Endocrin. 41, 24 (1962)
45. PURVES, H.D., and Assay of corticotrophin in dexamethasone-
N.E. SIRETT: treated rats.
Endocrinology 77, 366 (1965)

46. RETIENE, K.,
A. ESPINOZA,
K.H. MARX und
E.F. PFEIFFER:
Über das Verhalten von ACTH und Cortisol im Blut von Normalen und von Kranken mit primärer und sekundärer Störung der Nebennierenrindenfunktion.
Klin. Wschr. 43, 205 (1965)
47. OHSAWA, N.:
Effect of administration of ACTH on adrenal responsiveness of hypophysectomized rats.
Endocrinology 77, 461 (1965)
48. SCRIBA, P.C.:
Habilitationssarbeit Universität München
1966
49. SCRIBA, P.C.,
R. HACKER,
P. DIETERLE,
F. KLUGE,
W. HOCHHEUSER UND
K. SCHWARZ:
Manuskript in Vorbereitung
ACTH-Bestimmung im Plasma aus dem Bulbus cranialis venae jugularis
Klin. Wschr. 24, 1393 (1966)
50. v. LANZ, T. und
W. WACHSMUTH:
Praktische Anatomie, Bd. I, 2
Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1955), 31.
51. ANDERSON, E.:
The hypothalamus and adrenocorticotrophic hormone release. In "The adrenal cortex", Ed. H.D. Moon, P.B. Hoeber Inc., N.Y. (1961), 189.
52. De MOOR, P., and
O. STEENO:
Comparison of three techniques for the fluorimetric determination of plasma corticosteroids.
J. Endocrinol. 28, 59 (1963)
53. MATTINGLY, D.,
P.M. DENNIS,
J. PEARSON and
C.L. COPE:
A simple fluorimetric method for the estimation of free 11-hydroxycorticoids in human urine.
Lancet 1046 (1964) II
54. HOCHHEUSER, W.,
M. MÜLLER-BARDORFF, P.C. SCRIBA und
K. SCHWARZ:
Fluorimetrische Bestimmung der 11-Hydroxycorticosteroide im Plasma unter der Therapie mit Corticoiden.
12. Sympos. Dt. Ges. Endokrinol., Wiesbaden, Springer (1966) im Druck
55. GALICICH, J.H.,
F. HALBERG,
L.A. FRENCH, and
F. UNGAR:
Effect of cerebral ablation on a circadian pituitary adrenocorticotrophic rhythm in C mice.
Endocrinology 76, 895 (1965)

56. GRABER, A.L., J.R. GIVENS, W.E. NICHOLSON, D.P. ISLAND, and G.W. LIDDLE: Persistence of diurnal rhythmicity in plasma ACTH concentrations in cortisol-deficient patients. *J. clin. Endocrinol.* 25, 804 (1965)
57. VAGNUCCI, A.I., M.E. HESSER, G.P. KOZAK, G.L. PAUK, D.P. LAULER, and G.W. THORN: Circadian cycle of urinary cortisol in healthy subjects and in Cushing's syndrome. *J. clin. Endocrinol.* 25, 1331 (1965)
58. GUILLEMIN, R.: Biochemie und Physiologie der hypothalamischen Hormone
Referat. *Verh. Dt. Ges. Inn. Med.* 71, 61 (1965)
59. VERNIKOS-DANELIS, J.: Effect of stress, adrenalectomy, hypophysectomy and hydrocortisone on the corticotropin-releasing activity of rat median eminence. *Endocrinology* 76, 122 (1965)
60. DAVIDSON, J.M., I. CHOWERS, and S. FELDMAN: ACTH secretion in rats with intracerebral hydrocortisone implants
Fed. Proc. 22, No. 2455 (1963)
61. EGDAHL, R.H.: The acute effects of steroid administration on pituitary adrenal secretion in the dog
J. clin. Invest. 43, 2178 (1964)
62. De WIED, D.: The Site of the Blocking Action of Dexamethasone on stress-induced Pituitary-
ACTH-Release
J. Endocrin. 29, 29-37 (1964)
63. STAEHELIN, M., P. BARTHE, and P.A. DESAULLES: On the mechanism of the adrenal gland response to adrenocorticotrophic hormone in hypophysectomized rats. *Acta Endocrin.* 50, 55 (1965)
64. URQUHART, J.: Adrenal blood flow and the adrenocortical response to corticotropin
Amer. J. Physiol. 209, 1162 (1965)
65. PORTER, J.C., and M.S. KLAIBER: Corticosterone secretion in rats as a function of ACTH input and adrenal blood flow.
Amer. J. Physiol. 209, 811 (1965)

66. DIEM, K.: Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen. 6. Auflage, J.R. Geigy S.A., Basel 1960
67. GADDUM, J.H.: Bioassay and mathematics. Pharmacolog. Rev. 5, 87 (1953)
68. WOLF, R.L.,
M. MENDLOWITZ,
L.J. SOFFERS,
J. ROBOZ, and
S.E. GILTOW: Metabolism of corticotropin in man
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119,
244 (1965)
69. RETIENE, K.,
M. FISCHER,
H. DITSCHUNEIT und
E.F. PFEIFFER: Biologische Halbwertszeit von exogenem
ACTH im menschlichen Blut
9. Sympos. Dt. Ges. Endocrinol. Springer-
Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg
(1962)
70. SCHWARZ, K.,
P.C. SCRIBA und
G.G. HOFMANN: Die intravenöse Glucose-Belastung und
die Erfassung einer latenten Nebennieren-
rindeninsuffizienz während und nach
Corticosteroidtherapie
Verh. Dt. Ges. Inn. Med. 71, 360 (1965)
71. SCHWARZ, K. und
P.C. SCRIBA: Encokrin bedingte Encephalopathien.
Referat. Verh. Dt. Ges. Inn. Med. 72,
(1966) im Druck
72. MARGUTH, F.: Differentialdiagnostik der Geschwülste
im Bereich des Türkensattels
Dt. med. Wschr. 89, 1839 (1964)
73. BATES, R.W.,
S. MILKOVIC, and
M.M. GARRISON: Effects of prolactin, growth hormone
and ACTH, alone and in combination,
upon organ weights and adrenal function
in normal rats.
Endocrinology 74, 714 (1964)
74. MAUTALEN, C.A.,
and R.C. MELLINGER: Nonsuppressible adrenocortical function
in a patient with untreated acromegaly
J. clin. Endocrin. 25, 1423 (1965)
75. NELSON, D.H.
J.W. MEAKIN,
J.B. DEALY,
D.D. MATSON,
K. EMERSON, and
G.W. THORN: ACTH-producing tumor of the pituitary
gland
New England J. Med. 259, 161 (1958)
76. NELSON, D.H.,
J.W. MEAKIN, and
G.W. THORN: ACTH-producing pituitary tumors
following adrenalectomy for Cushing's
syndrome
Ann. Intern Med. 52, 560 (1960)

77. LIDDLE, G.W.: Test of pituitary-adrenal suppressibility in the diagnosis of Cushing's syndrome
J. clin. Endocrinol. 20, 1539 (1960)
78. SCRIBA, P.C. und K. SCHWARZ: Zur Früherfassung einer latenten diabetischen Stoffwechsellaage
Mchn. Med. Wschr. 106, 1522 (1964)
79. DRUCKER, W.D., M.S. ROGINSKY, and N.P. CHRISTY: Persistence of abnormal pituitary-adrenal relationship in patients with Cushing's disease partially corrected by bilateral subtotal adrenalectomy
Am. J. Med. 38, 522 (1965)
80. RETIENE, K., A. ESPINOZA, Y. ABDEL RAHMAN, K.H. MARX und E.F. PFEIFFER: Untersuchungen über den Transport und die Tagesrhythmik von endogenem ACTH im Blut bei Stoffwechselgesunden und Cushing-Kranken.
10. Sympos. Dt. Ges. Endokrinol. 231 (1963), Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg
81. NUGENT, C.A., K. EIK-NES, H.S. KENT, L.T. Samuels, and F.H. TYLER: A possible explanation for Cushing's syndrome associated with adrenal hyperplasia
J. clin. Endocrinol. 20, 1259 (1960)
82. THORN, G.W.: The diagnosis and treatment of adrenal insufficiency
Second edition, C.C. Thomas Publ., Springfield, Ill. (1951)
83. BARTTER, F.C., F. ALBRIGHT, A.P. FORBES, A. LEAF, E. DEMPSEY, and E. CARROLL: The effects of adrenocorticotrophic hormone and cortisone in the adrenogenital syndrome associated with congenital adrenal hyperplasia: an attempt to explain and correct its disordered hormonal pattern
J. clin. Invest. 30, 237 (1951)
84. RICHARDS, J.B., and G. SAYERS: Fate and excretion of adrenocorticotrophic hormone.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 77, 87 (1951)
85. GREENSPAN, F.S., C.H. LI, and H.M. EVANS: Disappearance rate of ACTH from rat's plasma after i.v. injection
Endocrinology 46, 261 (1950)

86. MELICK, R.A.,
G.D. AURBACH, and
J.T. POTTS: Distribution and half-life of ^{131}I -
labeled parathyroid hormone in the
rat
Endocrinology 77, 198 (1965)
87. RAITH, L., und
H.J. KARL: Biologische Halbwertszeit, Abbau und
Ausscheidung von 16-Methylenpred-
nisolon
Klin. Wschr. 44, 298 (1966)
88. BEISEL, W.R.,
DIRAIMONDO, V.C.,
and P.H. FORSHAM: Cortisol Transport and Disappearance
Ann. Int. Med. 60, 641 (1964)
89. ENGEL, F.L.: Extraadrenal Actions of Adrenocortico-
tropin in "Vitamins and Hormones"
Academic Press, N.Y. 194 (1961)
90. GUILLEMIN, R.,
C. FORTIER, and
H.S. LIPSCOMB: Comparison of in vitro and in vivo
assaying procedures for rat adeno-
hypophyseal corticotrophin.
Endocrinology 64, 310 (1959)
91. KRACHT, J.: Das Hypophysennebennierenrinden-
System bei Cushing-Syndrom
Verh.Dt.Ges.Pathol. 47, 280 (1963)

LEBENS LAUF

Mein Name ist Robert Hacker. Ich wurde am 18. 7. 1939 als Sohn des Kriminalbeamten Peter Hacker und seiner Frau Betti Hacker, geborene Deinzer, in Nürnberg geboren. Von September 1945 bis Juli 1949 besuchte ich, zunächst in Rupprechtstegen an der Pegnitz, später in Bayreuth, wohin meine Familie nach Kriegsende verzogen war, die Volksschule. Im September 1949 trat ich in die 1. Klasse der Oberrealschule Bayreuth ein, die ich im Juli 1958 nach Ablegung des Abiturs wieder verließ.

Mein Studium begann ich im Wintersemester 1958/59 an der Universität Erlangen, wo ich nach dem 2. bzw. 5. Semester die naturwissenschaftliche und ärztliche Vorprüfung bestand. Nach dem ersten klinischen Semester wechselte ich an die Universität München, wo ich mich neben dem Studium mit Problemen des Nachweises von Angiotensin im menschlichen Plasma beschäftigte. Im Anschluß an das 11. Semester bestand ich im Sommer 1964 die ärztliche Prüfung. Die zweijährige Medizinalassistentenzeit verbrachte ich an der II. Medizinischen Klinik, der I. Frauenklinik und der Chirurgischen Klinik, alle an der Universität München. Während dieser Zeit entstand auch, teils neben der klinischen Arbeit, die vorliegende Dissertation. Die Medizinalassistentenzeit endete am 30. Sept. 1966.

